

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Damjan ŽERJAV

**IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA METABOLITOV  
NITRENDIPINA, FAMCIKLOVIRJA,  
RALOKSIFENA IN VERAPAMILA PO  
KOINKUBACIJI Z IZBRANIMI SEVI  
MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Damjan Žerjav

**IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA METABOLITOV NITRENDIPINA,  
FAMCIKLOVIRJA, RALOKSIFENA IN VERAPAMILA PO KOINKUBACIJI Z  
IZBRANIMI SEVI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ**

MAGISTRSKA NALOGA  
Magistrski študij - 2. stopnja

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF METABOLITES OF NITRENDIPINE,  
FAMCICLOVIR, RALOXIFENE AND VERAPAMIL AFTER COINCUBATION  
WITH SELECTED STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija –2. stopnja Biotehnologija.  
Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo na Institutu »Jožef Stefan« in na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Po sklepu komisije 1. in 2. stopnje študija Biotehnologije iz dne, 20. 6. 2012, je bil za mentorja predlagan prof. dr. Borut Štrukelj, za somentorja doc. dr. Aleš Berlec in za recezентko prof. dr. Irena Rogelj.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut Štrukelj  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo

Član: doc. dr. Aleš Berlec  
Institut »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo

Član: prof. dr. Irena Rogelj  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Inštitut za mlekarstvo in probiotike

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Damjan Žerjav

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 602.3:579.864:615(043.2)=163.6  
KG prebavna mikrobiota/prebavila/metabolizem/zdravilne učinkovine/ mlečnokislinske bakterije/ probiotiki/ laktobacili/*Lactobacillus*  
AV ŽERJAV, Damjan  
SA ŠTRUKELJ, Borut (mentor)/ BERLEC, Aleš (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2014  
IN IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA METABOLITOV NITRENDIPINA, FAMCIKLOVIRJA, RALOKSIFENA IN VERAPAMILA PO KOINKUBACIJI Z IZBRANIMI SEVI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)  
OP IX, 70 str., 17 pregl., 20 sl., 71 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V sodobnem času smo zaradi vse večje razširjenosti različnih bolezni primorani jemati zdravila. Hkrati se širi uporaba probiotikov v prehrambene in zdravstvene namene in posledično pogosto pride do hkratnega uživanja probiotikov in zdravil. Probiotične kulture so potencialno sposobne metabolizirati učinkovine oz. zmanjšati njihovo delovanje. V magistrski nalogi smo deset izbranih sevov bakterijskih vrst iz rodu *Lactobacillus* koinkubirali z zdravilnimi učinkovinami nitrendipin, famciklovir, raloksifen in verapamil v tekočem gojišču MRS. Preverjali smo vpliv sevov na posamezno zdravilno učinkovino in nekatere njihove metabolite. Zanimal nas je le vpliv na celokupno vsebnost učinkovin. Pri nitrendipinu nismo mogli potrditi vpliva laktobacilov na znižanje koncentracije učinkovine, ugotovili pa smo vpliv na vsebnost metabolita dehidronitrendipina. Laktobacili so v gojišču MRS najbolj vplivali na vsebnost famciklovirja (vsebnost je znižalo 8 sevov, znižanje je bilo v povprečju 13 %). Laktobacili niso vplivali na vsebnost metabolitov penciklovir in deacetil famciklovir. Vsebnost raloksifena je signifikantno znižalo 5 sevov (v povprečju za 10 %), vsebnost verapamila pa 7 sevov (v povprečju za 12 %). Predvidevamo, da je do znižanja koncentracij zdravilnih učinkovin prišlo zaradi absorpcije/adsorpcije s strani laktobacilov ali pa zaradi metabolizma s strani njihovih metabolnih encimov. Laktobacili različno vplivajo na posamezno zdravilno učinkovino, vpliv pa je odvisen od posameznega seva ter od zgradbe posamezne molekule. Menimo, da bi morali biti pri sočasnem uživanju probiotikov in zdravilnih učinkovin pozorni na morebitne interakcije.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDC 602.3:579.864:615(043.2)=163.6  
CX gut microbiota/gastrointestinal/metabolism/active substances/ lactic acid bacteria/probiotics/*Lactobacillus*/lactobacilli  
AU ŽERJAV, Damjan  
AA ŠTRUKELJ, Borut (supervisor)/BERLEC, Aleš (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2014  
TY ISOLATION AND IDENTIFICATION OF METABOLITES OF NITRENDIPINE, FAMCICLOVIR, RALOXIFENE AND VERAPAMIL AFTER COINCUBATION WITH SELECTED STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO IX, 70 p., 17 tab., 20 fig., 71 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB In modern times there is a concurrent expansion in the use of medicines (due to increasing prevalence of various diseases) on one side and use of probiotics in food and medical purposes on the other side. Probiotic products are often consumed simultaneously with drugs. Probiotic cultures are potentially able to metabolize or degrade substances or reduce their function. We selected 10 strains bacterial species from genus *Lactobacillus* and coincubated them with active substances nitrendipine, famciclovir, raloxifene and verapamil in liquid medium MRS. We tested the response of strains on overall content of each active substance and some of their metabolites. We could not confirm the influence of lactobacilli on the reduction of nitrendipine, but we found an impact on the content of the metabolite dehydronitrendipin. The content of famciclovir was significantly reduced by 8 strains of lactobacilli for 13 % on average in medium MRS. We could not confirm the influence of lactobacilli on metabolites penciclovir and deacetil famciclovir. The content of raloxifene was significantly decreased by 5 strains for 10 % on average, and the content of verapamil was reduced by 7 strains for 12 % on average. Reduction of the concentration may be associated with absorption/adsorption by lactobacilli or activity of their metabolic enzymes. The impact of lactobacilli on active substances differs in dependence of each strain and the structure of substance. Attention should be paid to possible interactions during simultaneous consumption of probiotics and medicines.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN MAGISTRSKE NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 MIKROBI V PREBAVNEM TRAKTU .....	3
2.1.1 Funkcije prebavne mikrobiote .....	4
2.1.2 Metabolna aktivnost prebavne mikrobiote .....	5
2.2 METABOLIZEM ZDRAVILNIH UČINKOVIN S STRANI PREBAVNE MIKROBIOTE .....	6
2.3 BAKTERIJE RODU <i>LACTOBACILLUS</i> .....	11
2.3.1 Metabolizem bakterijskih vrst iz rodu <i>Lactobacillus</i> .....	11
2.3.2 Metabolizem zdravilnih učinkovin s strani bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> ....	13
2.4 PROBIOTIKI.....	13
2.5 ZDRAVILNE UČINKOVINE.....	15
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>20</b>
3.1 MATERIALI.....	21
3.1.1 Bakterijski sevi.....	21
3.1.2 Trdno in tekoče gojišče MRS.....	21
3.1.3 Zdravilne učinkovine.....	22
3.1.4 Pufri za umerjanje pH metra .....	23
3.1.5 Aparature in ostala laboratorijska oprema .....	23
3.2 METODE.....	24
3.2.1 Oživljanje bakterij s cepljenjem zamrznjene kulture na trdno gojišče MRS .....	24
3.2.2 Priprava prekonočnih kultur .....	24
3.2.3 Priprava delovne kulture .....	25
3.2.4 Nacepitev in gojenje delovne kulture.....	25
3.2.5 Merjenje optične gostote s spektrofotometrom .....	26

<b>3.2.6 Dodatek zdravilne učinkovine in koinkubacija bakterijske kulture z zdravilno učinkovino.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.7 Ločevanje supernatanta od trdnega dela brozge in shranjevanje vzorcev .</b>	<b>28</b>
<b>3.2.8 Odstranjevanje ostankov vzorcev in ostalega uporabljenega materiala.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.9 Določanje rastne krivulje proučevanih sevov laktobacilov .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.10 Merjenje pH vrednosti .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.11 Analiza vzorcev z LC-MS/MS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.12 Statistična obdelava rezultatov.....</b>	<b>33</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>34</b>
4.1 OŽIVLJANJE SEVOV IN IZGLED KOLONIJ .....	34
4.2 IZGLED PREKONOČNIH KULTUR.....	35
4.3 GOJENJE DELOVNIH KULTUR .....	38
4.3.1 Rastne krivulje sevov <i>Lactobacillus</i> .....	38
4.3.2 Čas gojenja sevov rodu <i>Lactobacillus</i> v delovni kulturi in izmerjena optična gostota po inkubaciji.....	39
4.4 PH VREDNOSTI DELOVNIH KULTUR SEVOV <i>LACTOBACILLUS</i> OB ZAKLJUČKU INKUBACIJE (OD~2,0) .....	40
4.5 DOLOČITEV KONCENTRACIJ UČINKOVIN IN NJIHOVIH METABOLITOV PO INKUBACIJI S KULTURAMI BAKTERIJ IZ RODU <i>LACTOBACILLUS</i> .....	41
4.5.1 Določanje koncentracije nitrendipina in njegovih metabolitov .....	41
4.5.2 Določanje koncentracije famciklovirja in njegovih metabolitov .....	46
4.5.3 Določanje koncentracije raloksifena.....	51
4.5.4 Določanje koncentracije verapamila.....	52
4.5.5 Rezultati testa ANOVA .....	53
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>55</b>
5.1 RAZPRAVA .....	55
5.2 SKLEPI.....	61
<b>6 POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>62</b>
6.1 POVZETEK .....	62
6.2 SUMMARY .....	63
<b>7 VIRI .....</b>	<b>64</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin in njihovih lastnosti (DrugBank, 2013).....	15
Preglednica 2: Sestavine trdnega gojišča MRS .....	22
Preglednica 3: Sestavine tekočega gojišča MRS .....	22
Preglednica 4: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin.....	22
Preglednica 5: Pregled uporabljenih pufrov .....	23
Preglednica 6: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili med poskusom .....	23
Preglednica 7: Opisi kultur sevov <i>Lactobacillus</i> v tekočem gojišču MRS po inkubaciji pri 37 °C .....	36
Preglednica 8: Optične gostote kultur sevov vrst <i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243) in <i>Lb. paracasei</i> po 4,5, 6,5 in 23 urah inkubacije na 37 °C pri nacepitvi 100 µl prekonočne kulture v gojišče MRS (n=3).....	37
Preglednica 9: Prikaz izmerjene optične gostote treh paralelk sevov <i>L. gasseri</i> (ATCC 20243) in <i>L. paracasei</i> po 4,5 in 7,5 urah inkubacije na 37 °C pri nacepitvi 500 µl prekonočne kulture v pdelovno kulturo .....	37
Preglednica 10: Povprečna vsebnost ionov nitrendipin quantifier in nitrendipin qualifier ter izračanano razmerje med njima v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin.....	43
Preglednica 11: Odstotek povprečne vsebnosti nitrendipina v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov <i>Lactobacillus</i> glede na vsebnost v kontroli..	44
Preglednica 12: Povprečna vsebnost ionov famciklovir quantifier in famciklovir qualifier ter izračanano razmerje med njima v vzorcih supernatanov kultur sevov in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir.....	48
Preglednica 13: Odstotek povprečne vsebnosti famciklovirja v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov <i>Lactobacillus</i> glede na vsebnost v kontroli..	49
Preglednica 14: Odstotek povprečne vsebnosti raloksifena v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov <i>Lactobacillus</i> glede na vsebnost v kontroli..	52
Preglednica 15: Odstotek povprečne vsebnosti verapamila v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov <i>Lactobacillus</i> glede na vsebnost v kontroli..	53

Preglednica 16: Rezultati po ANOVA testu, ki prikazujejo stopnjo statično značilnega zmanjšanja koncentracije zdravilnih učinkovin pri posameznemu vzorcu. .... 54

Preglednica 17: Rezultati ANOVA testa, ki prikazujejo F-vrednost, stopnjo signifikance, p-vrednost in  $R^2$  – vrednost za vse vzorce supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* po koinkubaciji s posamezno zdravilno učinkovino. .... 54

## KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz sisanja svetlobe v spektrometriji (Matlock in sod., 2011).....	27
Slika 2: Naprava LC-MS/MS (Velika..., 2014).....	30
Slika 3: Shematski prikaz delovanja LC-MS/MS (Grebe in Singh, 2011:3).....	31
Slika 4: Izrasle kolonije sevov laktobacilov na trdnem gojišču MRS po inkubaciji pri 37 °C (od leve proti desni sevi vrst: <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. gasseri</i> (K7), <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> ) .....	34
Slika 5: Sevi vrst <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. gasseri</i> (K7) in <i>Lb. acidophilus</i> .....	35
Slika 6: Prikaz povprečnih vrednosti izmerjene optične gostote bakterijskih kultur v odvisnosti od časa inkubacije za posamezne seve <i>Lactobacillus</i> . .....	38
Slika 7: Čas inkubacije posameznega seva laktobacilov do optične gostote OD~2,0 v posameznih serijah inkubacije delovne kulture. ....	39
Slika 8: Povprečna vrednost izmerjene optične gostote kultur sevov laktobacilov z odstopanjem v posamezni seriji gojenja .....	40
Slika 9: pH vrednosti kultur sevov <i>Lactobacillus</i> po inkubaciji pri 37 °C in doseženi optični gostoti OD~2,0.....	41
Slika 10: Vsebnost iona nitrendipin quantifier v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin.	42
Slika 11: Vsebnost iona nitrendipin qualifier v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin	42
Slika 12: Struktura formula spojine dehidronitrendipin (Dehydro..., 2014) .....	44
Slika 13: Vsebnost spojine dehidronitrendipin v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin ..	45
Slika 14: Strukturne formule spojin identificirane v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir (DrugBank, 2013, in PubChem, 2013). .....	46
Slika 15: Vsebnost iona famciklovir quantifier v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir. ....	47
Slika 16: Vsebnost iona famciklovir qualifier v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir.	47
Slika 17: Vsebnost spojine penciklovir v vzorcih supernatantov kultur sevov <i>Lactobacillus</i> in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir. ....	49

- Slika 18: Vsebnost spojine deacetil famciklovir v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontrolnem vzorcu po koinkubaciji sevov z zdravilno učinkovino famciklovir..... 50
- Slika 19: Vsebnost spojine raloksifen v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino raloksifen. .... 51
- Slika 20: Vsebnost spojine verapamil v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino verapamil. .... 52

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>5-ASA</b>	5 amino salicilna kislina; ang. »5-amino salicilic acid«
<b>APCI</b>	atmosfersko-tlačna kemijska ionizacija; ang. »atmospheric pressure chemical ionisation«
<b>CFU</b>	enote, ki tvorijo kolonije; ang. »Colony-forming unit«
<b>CID</b>	disociacije inducirane s trčenjem; ang. »collision-induced dissociation«
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kislina; ang. »Deoxyribonucleic acid«
<b>EI</b>	elektroionizacija; ang. »electroionisation«
<b>EMP</b>	Embden-Meyerhof-Parnasova metabolna pot
<b>ESI</b>	elektroionizacija z razprševanjem; ang. »electrospray ionisation«
<b>F</b>	vrednost, ki nam poda podatek o varianci med sevi
<b>FAME</b>	metil ester maščobnih kislin; ang. »fatty acid methyl ester«
<b>GC</b>	plinska kromatografija; ang. »gas chromatography«
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex virus 1
<b>HSV-2</b>	Herpes simplex virus 2
<b>KE/ml</b>	kolonijskih enot na mililiter; ang. »colony forming unit (CFU/ml)«
<b>Lb.</b>	<i>Lactobacillus</i>
<b>LC</b>	tekočinska kromatografija ang. »liquid chromatography«
<b>LD<sub>50</sub></b>	standardizirano merilo za izražanje in primerjavo toksičnosti kemikalij, odmerek, ki povzroči smrt pri polovici testnih organizmov; ang. »lethal dose«
<b>MALDI</b>	matrično posredovano lasersko desorpциjo/ionizacijo; ang. »matrix assisted laser desorption/ionization«
<b>MRM</b>	večkratno spremljanje reakcije; ang. »multiple reaction monitoring«
<b>MRS</b>	gojišče »de Man, Rogosa, Sharpe«
<b>MS</b>	masna spektrometrija; ang. »mass spectrometry«
<b>OD</b>	optična gostota; ang. »optical density«
<b>p</b>	vrednost za potrditev ničelne hipoteze
<b>Q</b>	kvadropol; ang. »quadrupole«
<b>R<sup>2</sup></b>	vrednost, ki je del celotne variance in se nanaša na povprečja skupin
<b>RNK</b>	ribonukleinska kislina; ang. »Ribonucleic acid«
<b>SERM</b>	selektivni modulator estrogenskih receptorjev; ang. »selective estrogen receptor modulator«
<b>TGF - β3</b>	rastni faktor beta 3; ang. »Transforming growth factor beta 3«
<b>TRP-1-P</b>	triptofan-1-pirofosfat
<b>TRP-2-P</b>	triptofan-2-pirofosfat
<b>VZV</b>	Varicella zoster virus

## 1 UVOD

Živimo v času, ko smo zaradi takšnih ali drugačnih razlogov izpostavljeni raznim boleznim. Farmacevtska, kemična in biotehnološka podjetja so že odkrila ali še odkrivajo zdravila za številne bolezni. Na drugi strani pa imamo živilsko industrijo, ki nam vsak dan ponuja nove probiotične izdelke in prehranska dopolnila, ki pripomorejo k človekovemu boljšemu počutju. Ob sočasnem jemanju (ali v krajšem časovnem intervalu) zdravil in probiotičnih izdelkov pa se največkrat pozablja dejstvo, da lahko pride do neželenih interakcij ali celo do metabolizma zdravilnih učinkovin s strani probiotičnih mikroorganizmov.

V preteklosti so različni avtorji različno definirali probiotike. Iz vseh definicij so izoblikovali današnjo, ki pravi, da so probiotiki pripravki ali proizvodi, ki vsebujejo zadostno število mikroorganizmov, da učinkujejo na mikrobioto gostitelja in imajo s tem pozitivne zdravstvene učinke na gostitelja (Schrezenmeir in de Vrese, 2001). Številni viri, med njimi tudi Ljungh in Wadström (2009) ter Heller (2001) kot »začetnika« probiotikov navajajo Elie Metchnikoff, ki je s svojimi kolegi v vzhodni Evropi raziskoval mikrobiologijo jogurta in mleka ter kot prvi opisal številne mikroorganizme, ki sodelujejo v naravnih fermentacijah. Probiotike uporabljajo za preprečevanje ali zdravljenje nekaterih gastrointestinalnih motenj kot so driske (Vanderhoof in Young, 1998), za krepitev imunskega sistema (McCracken in Gaskins, 1999), v zadnjem času pa se pojavljajo tudi študije, v katerih preučujejo učinkovitost izbranih sevov mlečnokislinskih bakterij pri nekaterih rakastih obolenjih (Iyer in Versalovic, 2009). Najpogosteje se v probiotičnih izdelkih pojavljajo sevi rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* (Heller, 2001). Tako smo tudi mi pri svojem delu uporabili deset sevov rodu *Lactobacillus*.

Seve iz rodu *Lactobacillus* smo koinkubirali s štirimi zdravilnimi učinkovinami, ki se v raznih farmacevtskih oblikah pogosto uporabljajo za zdravljenih različnih bolezni. Tako smo pri svojem delu uporabili zdravilne učinkovine:

- nitrendipin, ki spada v skupino zaviralcev kalcijevih kanalov, uporablja pa se za zdravljenje blage do akutne hipertenzije;
- famciklovir, ki je predzdravilo za aktivno obliko penciklovir; spada v skupino protivirusnih zdravil, najpogosteje pa se uporablja za zdravljenje virusa *Herpes zoster* in ponavljačega genitalnega herpesa;
- raloksifen, ki spada med protivnetna sredstva, uporablja pa se za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze pri ženskah v menopavzi;
- verapamil, ki je učinkovina iz skupine vazodilatatornih sredstev, uporablja pa se za zdravljenje hipertenzije, angine in preventivno za preprečevanje pogostih glavobolov (DrugBank, 2013).

## 1.1 NAMEN MAGISTRSKE NALOGE

Namen magistrske naloge je bil določiti vpliv desetih sevov mlečnokislinskih bakterij iz rodu *Lactobacillus* na vsebnost štirih zdravilnih učinkovin, ob sočasni inkubaciji v tekočem gojišču MRS. Namen naloge je tudi s pomočjo LC-MS/MS metode identificirati morebitne spojine, ki bi nastale po sočasni inkubaciji sevov s posamezno zdravilno učinkovino. Sevi vrst *Lactobacillus* bi lahko z metabolno aktivnostjo zniževali vsebnost zdravilnih učinkovin, prav tako pa bi lahko vplivali na tvorbo razpadnih produktov zdravilnih učinkovin.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Sevi vrst rodu *Lactobacillus* ob sočasni inkubaciji z zdravilnimi učinkovinami v tekočem gojišču MRS vplivajo na znižanje koncentracije zdravilnih učinkovin.
- Sevi vrst rodu *Lactobacillus* vplivajo na nastanek razpadnih produktov zdravilnih učinkovin z lastno metabolno aktivnostjo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIKROBI V PREBAVNEM TRAKTU

Kožne in mukozne površine človeškega telesa poseljujejo številni mikrobi, ki prihajajo iz okolja in tvorijo kompleksen ekosistem. Največjo in najbolj kompleksno združbo teh mikroorganizmov skriva prebavni trakt (Montalto in sod., 2009). Prebavni trakt naj bi tako vseboval 300-500 različnih mikrobnih vrst (Guarner in Malagelada, 2003), medtem ko Montalto in sod. (2009) navajajo, da naj bi se v prebavnem traktu nahajalo več kot 800 mikrobnih vrst s več kot 7000 sevi. Celokupno število mikrobnih celic v notranjosti črevesa pa je približno 10-krat večje od števila evkariontskih celic v človeškem telesu (Guarner in Malagelada, 2003). Mikrobna združba je v prebavnem traktu neenakomerno razporejena. Najmanj bakterij je v želodcu in v dvanaestniku, kjer je koncentracija bakterij  $10^3$  kolonijskih enot/ml (KE/ml), višja koncentracija mikrobov je v teščem in vitem črevesu, kjer je med  $10^4$  in  $10^8$  KE/ml, najvišja koncentracija bakterij pa je v debelem črevesu, in sicer  $10^{14}$  KE/ml (Montalto in sod., 2009). Guarner in Malagelada (2003) navajata, da je manjše število bakterij v zgornjem delu prebavnega trakta posledica sestave luminalnega medija (kislina, žolč, izločanje trebušne slinavke), ki uniči večino zaužitih mikroorganizmov, in posledica fazno-pogonske motorične aktivnosti vitega črevesa, ki ovira stabilno kolonizacijo črevesne slevtline. Mikrobna združba se kvantitativno in kvalitativno spremeni v gastrointestinalno mikrofloro (Rodney, 1996).

Konvencionalna bakteriološka analiza flore prebavnega trakta zahteva številne tehnike za gojenje bakterij na različnih rastnih gojiščih in pester nabor metod za taksonomko identifikacijo izolatov (Guarner in Malagelada, 2003). Z metodo, ki temelji na določanju nukleotidnega zaporedja genov ribosomalne RNK (16S rRNK) je bilo dokazano, da v prebavnem traktu prevladujejo obligatni anaerobi nad aerobi (Montalto in sod., 2009). Guarner in Malagelada (2003) kot tudi Montalto in sod. (2009) navajajo, da v prebavnem traktu prevladajo anaerobni mikrobi iz rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, in *Ruminococcus*. Med neprevladajoče mikrobe v prebavnem traktu pa spadajo aerobni oz. fakultativno anaerobni mikroorganizmi iz rodov *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus*. V črevesju pa so prisotni tudi nekateri aerobne glive, kot je *Candida albicans* (Montalto in sod., 2009).

V črevesju vsakega posameznika najdemo več sto različnih sevov bakterijskih vrst, ki pripadajo omenjenim rodovom, z določeno kombinacijo prevladujočih sevov, ki se razlikuje od kombinacij pri drugih posameznikih. Sevi med posamezniki zelo variirajo. Sestava posameznikove mikroflore lahko niha v nekaterih okoliščinah, kot so nekatera akutna diarejna boleznska stanja, zdravljenje z antibiotiki, ali, v manjši meri, prehranski posegi. Vsekakor pa je vzorec prebavne mikrobiote pri posamezniku zelo stabilen (Guarner in Malagelada, 2003).

### **2.1.1 Funkcije prebavne mikrobiote**

Številne fiziološke lastnosti prebavne mikrobiote prispevajo k splošnemu zdravju. Motnje ekološkega ravnotežja prebavne mikroflore lahko škodujejo zdravju. Bakterije, kot značilni predstavniki prebavne mikroflore, lahko posedujejo številne koristne lastnosti. Sposobne so razgrajevanja nekaterih sestavin hrane, proizvodnje nekaterih B vitaminov, spodbujanja imunskega sistema in tvorbe nekaterih prebavnih in zaščitnih encimov. Prav tako normalna mikroflora sodeluje pri metabolizmu nekaterih potencialno kancerogenih substanc in pripomore k aktivaciji zdravil (predzdravila) (Holzapfel in sod., 1998).

Raziskave na živalih, vzrejenih v pogojih brez prisotnosti živih mikroorganizmov (germ-free), so dale pomembne informacije o učinku mikrobne združbe v gastrointestinalnem traktu na gostiteljevo patologijo in fiziologijo. Nekatere študije so pokazale, da ima prebavna mikroflora pomembne in specifične metabolne, trofične in zaščitne funkcije (O'Hara in Shanahan, 2006). Med poglavitevne metabolne funkcije štejemo presnova neprebavljivih ostankov hrane in endogene sluzi, ki jo proizvaja epitelij (Guarner in Malagelada, 2003). Genska diverziteta mikrobne združbe ponuja razne encime in biokemične poti, ki so drugačni od gostiteljevih (Brodie in sod., 1958). Pomemben vir energije v črevesju je presnova ogljikovih hidratov. Neprebavljeni ogljikovi hidrati vsebujejo veliko polisaharidov (odporni škrob, celuloza, hemiceluloza, idr.) ter veliko oligosaharidov, ki se izognejo prebavi. Končni produkt, pridobljen z mikrofloro, so kratkoverižne maščobne kisline, ki so hkrati z potencialno toksičnimi snovmi (spojine, ki vsebujejo amine, amoniak, fenole...) produkt razkroja polisaharidov. Prav tako pa ima mikroflora vlogo tudi pri sintezi vitaminov in absorpciji kalcija, magnezija in železa. Nastale kratko verižne maščobne kisline imajo pomembno vlogo tudi pri trofičnih funkcijah, in sicer stimulirajo proliferacijo in diferenciacijo epitelnih celic. Prebavna mikroflora tudi vpliva na razvoj imunskega sistema pri ljudeh in na homeostazo (Holzapfel in sod., 1998). Med zaščitne funkcije prebavne mikroflore pa lahko štejemo onemogočanje dostopa do črevesnih celic patogenim mikrobom. S pričvrstitevijo na epitel črevesa in izločanjem bakteriocinov ovirajo dostop in morebitno škodljivo delovanje patogenim organizmom (Guarner in Malagelada, 2003).

## 2.1.2 Metabolna aktivnost prebavne mikrobiote

Prebavna flora ima obsežno metabolno kapaciteto. Številne spojine, ki vstopajo v črevesje, prestanejo bakterijsko biotransformacijo, katera lahko spremeni njihovo toksikološko aktivnost. Prebavna flora tako razgrajuje toksične snovi, ki nastajajo v črevesju iz azo spojin, pomaga razgrajevati nitro spojine in nitrat. Prav tako je mikroflora sposobna razgrajevati aminokisline in njihove toksične produkte, toksične železove spojine, glukuronide, glikozide, sulfamate, žolčno kislino in holesterol (Rowland in sod., 1985). Prebava snovi s strani prebavne mikroflore poteka v številnih metabolnih reakcijah. Mednje uvrščamo hidrolizo, dekarboksilacijo, dealkilacijo, dehalogenacijo, deaminacijo, odprtje heterocikličnih obročev, aromatizacijo, formacijo nitrozamina, acetiliranje, esterifikacijo in druge reakcije. Prebavna mikroflora pa v prebavnem traktu vrši tudi reduciranje dvojnih vezi, reduciranje aldehidov, ketonov in alkoholov (Scheline, 1973).

Prebavna mikrobiota lahko zaradi svojega metabolnega potenciala predstavlja pomembno vlogo v zdravju človeka. Mikrobiom<sup>1</sup> prebavne mikrobiote okrepi nabor prebavnih genov gostitelja in poviša njegov metabolni potencial. Ocenjeno je, da mikrobnii genom v črevesju sestavlja med 2 in 4 milijone genov, kar je 70-140 – krat več kot je genov njihovega gostitelja. Mikrobiom obsega vse gene, ki so odgovorni za številne procese kot so razpad substratov, sinteza beljakovin, produkcija biomase, produkcija signalnih molekul, produkcija protimikrobnih spojin in vključujejo biokemijske poti, katerih človek nima razvitalih (Pandeya in sod., 2012).

### 2.1.2.1 Vplivi na metabolizem prebavne mikrobiote

Obstaja veliko različnih dejavnikov, ki regulirajo mikrobnio populacijo gastrointestinalnega trakta. Nekateri dejavniki izvirajo iz gostitelja, drugi iz kemikalij, katerim je gostitelj izpostavljen, nekateri dejavniki pa so posledica aktivnosti same mikrobiote. V posamezno skupino dejavnikov glede na izvor spadajo naslednji dejavniki:

- Gostiteljski dejavniki:
- vrsta gostitelja in posamezne razlike povezane z izločanjem kisline in baze, intestinalnim gibanjem, intestinalne strukture, količino endogenih hranil (črevesne beljakovine, žolčni izločki), redoks potenciala, žolčnih soli, protiteles,
  - starost,
  - bolezni gastrointestinalnega trakta.

---

<sup>1</sup> Izraz mikrobiom se nanaša na združbo genov in njihovih aktivnosti, ki so prisotni v dani bakterijski skupnosti (Haiser in Turnbaugh, 2012).

Okoljski dejavniki: - zdravila,  
- prehrana,  
- ksenobiotiki.

Bakterijski dejavniki: - bakterijski metaboliti,  
- bakterijske interakcije (kompeticija),  
- pH.

(Rowland, 1988).

## 2.2 METABOLIZEM ZDRAVILNIH UČINKOVIN S STRANI PREBAVNE MIKROBIOTE

V zadnjih letih je bila tematika metabolizma zdravilnih učinkovin s strani prebavne mikrobiote zapostavljena tako s strani akademije kot tudi farmacevtske industrije. Prebavni trakt tako povečini predstavlja pozabljen organ v metabolizmu zdravilnih učinkovin in njihovem razporejanju. To je lahko slabost, saj prebavna mikrobiota ni sposobna le široke palete biotransformacij učinkovin, pač pa je lahko tudi vir fiziološke variabilnosti med posamezniki. Mikroorganizmi lahko vplivajo na porazdelitev in toksičnost zdravilnih učinkovin in metabolitov, tako neposrednih, kot tistih, ki nastanejo s sekundarnimi interakcijami (Wilson in Nicholson, 2009). Mikroflora prebavnega trakta ima metabolni potencial podoben ali včasih tudi boljši, kot jetra, kar zadeva metabolizem zdravilnih učinkovin (Scheline, 1973). Je pa vsekakor pomembna razlika med jetrnim in bakterijskim metabolizmom. Jetra so primarno odgovorna za metabolizem preko oksidacije in konjugacije, pri tem pa nastanejo polarni metaboliti z visoko molekulsko maso. Medtem prebavna mikrobiota vrši reducirajoče in hidrolitične reakcije in proizvaja nepolarne produkte, ki imajo nizko molekularno maso (Sousa in sod., 2008).

Prebavna mikrobiota ima sposobnost, da se prilagodi prisotnosti neke tuje spojine v telesu. Prilagodi se lahko na tri različne načine:

- naključne mutacije lahko povečajo odpornost proti drugače toksičnim ksenobiotikom<sup>2</sup>,
- mutacije lahko povečajo mikrobeno sposobnost razgrajevanja ksenobiotikov,
- organizem lahko pridobi gene, ki kodirajo katabolne encime, od ostalih organizmov v okolju (Haiser in Turnbaugh, 2012).

---

<sup>2</sup> Ksenobiotik: spojine, ki so tuje živemu organizmu in v njem niso naravno prisotne. Običajno izraz opisuje terapevtska zdravila, antibiotike in s prehrano zaužite bioaktivne spojine (Haiser in Turnbaugh, 2012).

Večina zdravilnih učinkovin vstopa v človeško telo po peroralni poti, zaradi prikladnosti in najmanjše invazivnosti (Haiser in Turnbaugh, 2012). Peroralna pot dostave zdravil je verjetno najbolj kompleksna, kar zadeva dostave zdravilne učinkovine do mesta delovanja. Da so zdravila, vnesena v telo po peroralni poti učinkovita, se morajo raztopiti v vsebini gastrointestinalnega trakta, ostati nespremenjena v črevesni svetlini, preiti skozi epitelno membrano in prestati metabolizem prvega prehoda. Zdravilne učinkovine, ki so dostavljene v telo po peroralni poti, so običajno podvržene razgradnji v zgornjem delu prebavnega trakta. Razlog za razgradnjo zdravilnih učinkovin je največkrat povezan s pH vrednostjo ali z encimsko posredovano razgradnjo (Sousa in sod., 2008).

Zdravilne učinkovine, ki se v telo vnesejo po neki drugi poti (intravensko), ali se v celoti absorbirajo v zgornjem delu gastrointestinalnega trakta, lahko še vedno dosežejo spodnje dele črevesa. To se lahko zgodi z izločanjem ali z difuzijo iz sistemski cirkulacije v intestinalni prostor, ali pa se zdravilne učinkovine izločijo v žolč in nato sledijo postopku reciklaže, imenovanem enterohepatiko kroženje (Sousa in sod., 2008). Enterohepatiko kroženje je sestavni del človeške prebave in metabolizma zdravilnih učinkovin. Opišemo ga lahko kot cikel, sestavljen iz žolčnega izločanja topljenca, kateremu sledi črevesna reabsorbicija. Odvisno od raztopljene snovi lahko cikli vključujejo jetrno konjugacijo in črevesno dekonjugacijo (Haiser in Turnbaugh, 2012). Gre za kroženje, kjer se snovi v jetrih izločajo v žolč, ta preide v črevesje, kjer poteče reabsorbicija, nato pa se snovi preko portalnih ven ponovno vrnejo v jetra (Small in sod., 1972). Medtem ko cikli omogočajo, da se prehranski lipidi preko žolčnih kislin metabolizirajo do ponovne uporabe, se prav tako lahko omogoči stik črevesnih bakterij z intravensko aplicirano učinkovino (Haiser in Turnbaugh, 2012).

Nedostopnost človeškega črevesa onemogoča direktno raziskave metabolne in ekološke aktivnosti prebavne mikroflore. Idealna metoda, ki bi pojasnila vlogo prebavne flore v metabolizmu zdravilnih učinkovin, ne obstaja. Tako je tudi večina raziskav bolj usmerjenih v študijo specifičnih značilnosti črevesnega okolja, kot pa v simulacijo celotnega človeškega črevesa. (Holzapfel in sod., 1998). Najpogosteje se uporabljajo *in vitro* raziskave, saj so raziskave na ljudeh zamudne in zahtevajo medicinski nadzor in etično dovoljenje. Največji izziv *in vitro* študij je simulirati črevesno okolje skupaj s številčnostjo in diverzitetu mikroorganizmov (Wilson in Nicholson, 2009). Najenostavnejša izvedba raziskave metabolizma zdravilnih učinkovin s strani prebavne mikroflore je statična paketna kultura (vrste bakterij istega rodu), kjer se lahko uporabi seve bakterij, ki se jih doda v ustrezni medij, hkrati z zdravilno učinkovino. Izberejo se ustrezni vzorci in kvantificira se jim količina zdravilne učinkovine ter njenih metabolitov (Sousa in sod., 2008).

Študije kažejo, da so za metabolizem ksenobiotikov odgovorni številni encimi (Haiser in Turnbaugh, 2012). Največji človeški encimski sistem, ki sodeluje v metabolizmu zdravilnih učinkovin, predstavljajo monooksigenaze citkromi P450 (Meyer, 1996). V presnovi zdravilnih učinkovin pa sodelujejo tudi encimi, ki izvirajo iz mikrobne združbe (Brodie in sod., 1958). Ti lahko s svojim delovanjem vplivajo na farmakokinetične parametre (Stojančević in sod., 2013). Tako so encimi iz skupine  $\beta$ -glukoronidaz vključeni v dekonjugacijo ksenobiotikov v črevesju in dovoljujejo njihovo ponovno absorbcijo v okviru eterohepatskega kroženja ter tako podaljšajo njihov čas v telesu (Haiser in Turnbaugh, 2012). Med pomembnejše encime, ki so vključeni v metabolizem ksenobiotikov spadajo še  $\beta$  – glukozidaze, azoreduktaze in nitroredoktaze. Prav tako se je encimska aktivnost prebavne mikroflore izkazala za učinkovito pri zmanjšanju stranskih učinkov kemoterapevtskih zdravil. To je bilo dokazano v študiji metabolizma kemoterapevtske zdravilne učinkovine irinotekan (Haiser in Turnbaugh, 2012).

Na živalskih modelih (miši, podgane, morski prašički), je bilo narejenih kar nekaj študij metabolizma zdravilnih učinkovin s strani prebavne mikroflore. V številnih primerih gre za reakcije redukcije. Tako so v primeru redukcije azo spojin testirali zdravilne učinkovine prontozil, neoprontozil, sulfasalazin, balsalazid in olsalazin (Sousa in sod., 2008). Sulfasalazin je sestavljen iz protivnetne spojine 5-aminosalicilne kisline (5-ASA), ki je z azo vezjo povezana s sulfapiridinom. Omenjeni molekuli sta tudi produkta razpada sulfasalizina (Haiser in Turnbaugh, 2012). Pri ostalih zdravilnih učinkovinah so po encimski pretvorbi poleg 5-ASA nastali še sulfanilamid (neoprontozil) in 4-aminobenzoil- $\beta$ -alanin (balsalazid). Olsalazin je razpadel na dve molekuli 5-ASA. Pri pretvorbi azo spojin so sodelovali azoreduktazni encimi, ki jih tvorijo številne prebavne bakterije. Prav pretvorbi prontozila in neoprontozila v sulfanilamid sta prvi primer pretvorbe predzdravila v aktivno obliko (Sousa in sod., 2008).

Naslednji primer je učinkovina digoksin, ki se uporablja za zdravljenje kongestivnega srčnega popuščanja, aritmije in odpovedi srca (DrugBank, 2013) Zdravilna učinkovina se je s pomočjo črevesnih bakterij pretvorila v reducirane metabolite, ki so imeli precej nižjo farmakološko aktivnost (Wilson in Nicholson, 2009). Metabolizem zdravilne učinkovine digoksin s strani prebavne flore so dokazali tudi z dejstvom, da se je pri peroralnem vnosu učinkovine pojavilo veliko več reduciranih metabolitov, kot pa v primeru, ko je bila zdravilna učinkovina vnesena intravenozno (Sousa in sod., 2008).

Primer zdravilne učinkovine, kjer je prišlo do metabolne aktivnosti s strani prebavne mikroflore miši in podgan, je tudi nitrazepam. Ta se je s pomočjo mikroflore pretvoril v 7-aminonitrazepam in nato v jetrih do 7-acetilaminonitrazepam, ki se je pokazal kot teratogen (Takeno in sod., 1993). Zdravilna učinkovina klonazepam pa se je med metabolizmom pretvorila 7-aminoklonazepam (Elmer in Remmel, 1984). Prebavna flora je učinkovala tudi na zdravilno učinkovino misonidazol, ki jo je reducirala do lastnega amino derivata (Koch in sod., 1980). Zdravilna učinkovina omeprazol se je reducirala do sulfid metabolita, vendar le v pogojih *in vitro*. V pogojih *in vivo* pa prebavna flora ni spremenila oralne farmakokinetike, saj se je vsa spojina absorbirala preden je prispela do črevesja (Watanabe in sod., 1995). Pri zdravilni učinkovini sulfpirazon se je prebavna flora ponovno izkazala kot edini način reduciranja, produkt metabolizma pa je bil sulfpirazon sulfidni metabolit (Strong in sod., 1987, Sousa in sod., 2008).

Vzporedno s študijo metabolizma sulfpirazona so znanstveniki pregledali še reduciranje ne-steroidne protivnetne zdravilne učinkovine sulindac. Ugotovili so, da prebavna flora signifikantno prispeva k nastanku sulindac sulfida, ki nastane z reduciranjem suldinaca, ki se izloča v žolč (Strong in sod., 1987). Reducirajoč metabolismem prebavne mikroflore se je pokazal tudi pri zdravilnih učinkovinah zonisamid in metronidazol. Pri prvi je po reducirjanju benzoksazolnega obroča nastal 2-sulfomoilacetilfenol (Kitamura in sod., 1997), pri drugi pa je prebavna flora reducirala imidazolni obroč in nastala sta N-(2-hidroksietyl) oksamična kislina in acetamid (Koch in Goldman, 1979).

Redukcija posameznih zdravilnih učinkovin pa ni edini metabolni proces, s katerim prebavna mikroflora učinkuje na zdravilne učinkovine. Bakterije v prebavnem traktu so tako sposobne tudi hidrolize zdravilnih učinkovin. Hidroliza se je kot primer učinka prebavne flore na učinkovino pokazala pri učinkovini laktulozi. Laktulozo v prebavnem traktu hidrolizirajo različne vrste bakterij (*Lactobacillus*, *Bacteroides*, *E. coli*), pri čemer tvorijo mlečno in ocetno kislino, ki se nato v prebavnem traktu znižujejo pH vrednost. (Peppercorn in Goldman, 1976 cit. po Sousa in sod., 2008). Hidrolitičen metabolismem so opazili tudi pri zdravilni učinkovini sorividin, kjer je glavni metabolit (5-(2-bomovinil) uracil) inaktiviral ključni jetrni encim, imenovan DPD (Okuda in sod., 1998).

Prebavna flora je zmožna tudi odstranjevanja sukcinatne skupine. Primer takega metabolizma je zdravilna učinkovina sukcinilsulfatiazol, ki se je pretvoril do aktivnejše oblike sulfatiazol, ki ima močno antibakterijsko delovanje (Poth in sod., 1942 cit. po Sousa in sod., 2008).

Prebavna mikroflora ima tudi sposobnost dehidroksilacije. To je bilo dokazano na študiji zdravilne učinkovine L-DOPA, ki je najučinkovitejše zdravilo za zdravljenje Parkinsonove bolezni. Črevesna flora naj bi metabolizirala L-DOPA, s tem se zmanjša količina zdravila, ki bi prišla do centralnega živčnega sistema in posledično neželeno vplivala na zdravljenje (Goldin in sod., 1973, Haiser in Turnbaugh, 2012).

Na zdravilno učinkovino 5-aminosalicilna kislina je prebavna flora vplivala z acetilacijo (Deloménie in sod., 2001), zdravilno učinkovino fenacetin pa je bakterijska mikrobiota v majhnem deležu deacetilirala do p-fenetidina (Smith in Griffiths, 1974). Pri zdravilnih učinkovinah ranitidin in nizatidin je prišlo do cepitve N-oksidne vezi s strani prebavne mikroflore (Basit in Lacey, 2001, Basit in sod., 2004).

Eden od mehanizmov metabolizma zdravilnih učinkovin s strani prebane mikroflore je tudi. To se je izkazalo na peptidnih in beljakovinskih zdravilih, kot sta inzulin in kalcitonin (Tozaki in sod., 1997). Znane so tudi študije, kjer je črevesna flora sprožila denitrilacijo. To je bilo dokazano v študiji zdravilnih učinkovin gliceril trinitrat in izosorbid dinitrat (Abu Shamat, 1993). Črevesna flora je delovala tudi na zdravilno učinkovino kloramfenikol, in sicer s formacijo amina in hidrolizo amida (Holt, 1967).

Poznanih pa je še kar nekaj metabolnih reakcij, s katerimi je prebavna mikroflora delovala na zdravilne učinkovine. Tako poznamo reakcije odprtja tiazolnega obroča. Primer je učinkovina levamisol, pri kateri so se pojavili trije metaboliti z odprtim tiazolnim obročem (Shu in sod., 1991). Prebavna mikroflora je z mehanizmom izoksazolne razdružitve učinkovala na zdrvilno učinkovino risperidon, kjer je prišlo do cepitve benzizoksazolnega obroča (Meuldermans in sod., 1994). Deglikozilacijo zdravilne učinkovine s strani prebavnih bakterij so dokazali na učinkovini kvercetin-3-glikozid, kjer je nastala 3,4-dihiroksifenilacetna kislina (Schneider in sod., 2000). Kot mehanizem delovanja je bila dokazana tudi N-demetylacija in sicer na zdravilni učinkovini metamfetamin, kateri se je po koinkubaciji z črevesnimi bakterijami po večini pretvoril v amfetamin (Caldwell in Hawksworth, 1973).

Bakterijska mikroflora je metabolizirala tudi še druge zdravilne učinkovine, vendar pa mehanizem delovanja ni povsem pojasnjen ali pa je prišlo do kemijske pretvorbe. Tako se je kalijev oksalat pretvoril v cianurično kislino (Yoshisue in sod., 2000), flucitozin se je pretvoril v 5-fluorouracil (Vermes in sod., 2003), pri učinkovini hesperidin je prišlo do pretvorbe v hesperitin (Lee in sod., 2004), sojin izoflavonoid daidzein pa se je pod vplivom bakterijske mikroflore pretvoril v ekvol in dihidroaidzein (Rafii in sod., 2004, Haiser in Turnbaugh, 2012).

## 2.3 BAKTERIJE RODU *LACTOBACILLUS*

Bakterije rodu *Lactobacillus* so po Gramu pozitivni, nesporogeni mikroorganizmi. Glede na celične oblike se lahko pojavljajo v obliki palčk ali kokobacilov. So fermentativni, mikroaerofilni kemoorganotrofi, kar pomeni, da potrebujejo za rast bogato gojišče. So katalaza negativni, čeprav je pri nekaterih sevih včasih prisotna psevdokatalazna aktivnost. Glede na DNA bazno sestavo genoma imajo vsebnost GC nižjo od 54 % (Felis in Dellaglio, 2007).

Rod *Lactobacillus* filogenetsko pripada v deblo *Firmicutes*, v razred *Bacilli* in v red *Lactobacillales*, v katerem jih uvrščamo v največjo družino *Lactobacillaceae*. Med številnimi rodovi te družine velja omeniti še rodoval *Paralactobacillus* in *Pediococcus*, ki sta najbolj filogenetsko blizu z rodom *Lactobacillus* (Garrity in sod., 2004). Taksonomska razdelitev je bila v glavnem narejena na podlagi rezultata analize zaporedja 16S ribosomalne ribonukleinske kisline (16S rRNK) (Pot in Tsakalidou, 2009).

Naravno okolje bakterij rodu *Lactobacillus* se zelo razlikuje. Tako najdemo bakterije v hrani, rastlinah, odplakah, ustih, genitalnem in gastrointestinalnem traktu ljudi in živali. Nekatere bakterije v gastrointestinalnem traktu so koristne za zdravje, in sicer delujejo kot probiotiki – živi organizmi, ki v zadostni količini koristijo zdravju gostitelja (Claesson in sod., 2007).

Rod *Lactobacillus* vsebuje 106 veljavno opisanih vrst (Felis in Dellaglio, 2007), po drugih podatkih pa naj bilo 113 vrst (Pot in Tsakalidou, 2009). Tako je po številnosti to največji rod v redu *Lactobacillales*. Odkritih in opisanih pa je bilo še kar nekaj novih vrst, vendar še niso bile potrjene ali pa čakajo na publiciranje. Sedem vrst v rodu *Lactobacillus* obsega dve ali več podvrst (Felis in Dellaglio, 2007).

### 2.3.1 Metabolizem bakterijskih vrst iz rodu *Lactobacillus*

V grobem vrste *Lactobacillus* glede na metabolizem ogljikovih hidratov delimo na:

- obligatno homofermentativne laktobacile: ti so sposobni pretvarjati heksoze skoraj izključno v mlečno kislino po Embden-Meyerhof-Parnasovi (EMP) metabolni poti, medtem, ko pentoze in glukonate ne fermentirajo zaradi pomanjkanja fosfoketolaz;
- fakultativno heterofermentativne laktobacile: ti so sposobni razgrajevanja heksoz do mlečne kisline preko EMP metabolne poti hkrati pa so tudi sposobni razgrajevanja pentoz in glukonatov, saj posedujejo tako aldolaze kot tudi fosfoketolaze;

- obligatno heterofermentativne laktobacile: ti razgrajujejo heksoze preko fosfoglukonatne poti in tvorijo mlečno kislino, etanol ali ocetno kislino ter ogljikov dioksid; po podobni poti razgrajujejo tudi pentoze.

(Felis in Dellaglio, 2007).

V mlečnokislinskih bakterijah je metabolizem laktoze daleč najbolj preučevan metabolizem disaharida, saj je laktoza glavni ogljikov hidrat v mleku. Vzporedno z laktozo in glukozo, katero razgrajujejo po EMP-metabolni poti, so nekatere vrste iz rodu *Lactobacillus* sposobne razgrajevanja ostalih ogljikovih hidratov, kot so maltoza, fruktoza, razne pentoze s pomočjo encimov fosfoketolaz. Vire energije pa lahko nekateri sevi vrst *Lactobacillus* pridobivajo tudi z razgradnjo citrata (Pot in Tsakalidou, 2009).

Prvi pomemben metabolni sistem rodu *Lactobacillus* v presnovi hrane je katabolizem ogljikovih hidratov. Mlečnokislinske bakterije imajo enormno kapaciteto razgrajevanja različnih ogljikovih hidratov. Glavni produkt razgradnje številnih ogljikovih hidratov je mlečna kislina. Bakterije rodu *Lactobacillus* se lahko prilagodijo različnim pogojem in ustrezno spremenijo svoj metabolizem. Dolga leta je taksonomija rodu *Lactobacillus* temeljila na tipu presnove sladkorjev (Pot in Tsakalidou, 2009).

Drugi veliki metabolni sistem rodu *Lactobacillus* je proteolitični sistem, ki velja za najbolj zapletenega. Splošno znano je, da imajo mlečnokislinske bakterije omejene sposobnosti sintetiziranja esencialnih aminokislin, ki so nujne za njihovo rast (Pot in Tsakalidou, 2009). Mlečnokislinske bakterije imajo proteolitični sistem sposoben hidrolize prehranskih beljakovin do peptidov in aminokislin (Gänzle in sod., 2007).

Tretji metabolni sistem pa je lipolitični sistem. S pomočjo lipolitičnih encimov lahko razgrajujejo trigliceride, proste maščobne kisline nato pa do metil ketonov, laktonov, tioestrov, keto in hidroksi kislin. (Pot in Tsakalidou, 2009).

### 2.3.2 Metabolizem zdravilnih učinkovin s strani bakterij rodu *Lactobacillus*

Opisanih je kar nekaj različnih mehanizmov s katerimi bakterije rodu *Lactobacillus* vplivajo na zdravilne učinkovine. Eden takšnih je sposobnost vezave oz. inaktivacije toksičnih spojin, ki jih vsebuje hrana, med njimi pa se nahajajo heterociklični aromatski amini, policiklični aromatični ogljikovodiki, mikotoksini in reaktivne kisikove spojine (Fuchs in sod., 2007; Knassmüller in sod., 2001). Vpliv na omenjene spojine so opazili pri več sevih vrst *Lactobacillus*. Določeni sevi vrst *Lb. casei* so tako sposobni vezati triptofan-2-pirofosfat (Trp-2-P), vezava je odvisna od pH vrednosti, mehanizem detoksifikacije pa naj bi bil povezan s mehanizmom kationskega izmenjevalca (Knassmüller in sod., 2001). Uspešno vezavo Trp-2-P so ugotovili tudi pri sevih vrste *Lb. acidophilus* (Orrhage in sod., 1994), ki je močno zmanjšal tudi koncentracijo oharotoksina A (> 90 %) (Fuchs in sod., 2007). Zelo velik vpliv na omenjeno spojino pa so odkrili tudi pri sevih vrst *Lb. plantarum* in *Lb. rhamnosus* (Piotrowska in Zakowska, 2005). Pri sevu vrste *Lb. gasseri* naj bi za vezavo heterocikličnih aminov bili odgovorni deli ogljikovih hidratov v celični steni (Stidl in sod., 2008), dokazano pa je bilo z vezavo molekule triptofan-1-pirofosfat (Trp-1- P) (Knassmüller in sod., 2001). Sev vrste *Lb. rhamnosus* je z nekovalentno vezavo najbolje vezal Aflatoksin B<sub>1</sub>, ki velja za enega najbolj nevarnih kancerogenov (Fuchs in sod., 2007).

Med mehanizmi vplivanja sevov rodu *Lactobacillus* na zdravilne učinkovine so tudi kemijske reakcije, katerih produkt je pogosto H<sub>2</sub>S (Mikov, 1994). Pomemben mehanizem razgradnje zdravilnih učinkovin so tudi encimske reakcije, katere prispevajo sevi rodu *Lactobacillus* (Gänzle in sod., 2007).

## 2.4 PROBIOTIKI

Etimološko prihaja izraz probiotik iz Grščine, pomenil pa naj bi »za življenje«. Definicija probiotikov se je skozi čas razvijala vzporedno z večjim zanimanjem za uporabo živilih bakterijskih dodatkov in v zvezi z napredkom, doseženim pri razumevanju njihovega mehanizma delovanja (Kechagia in sod., 2013). Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki so se v ustrezнем odmerku izkazali kot koristni za gostiteljski organizem. Številne raziskave so podkrepile vlogo probiotikov kot učinkovitih dejavnikov za spremicanje črevesnega mikrobnega ravnoesa in zmanjšanja številnih kroničnih črevesnih bolezni (Arora in sod., 2013).

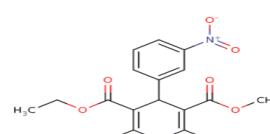
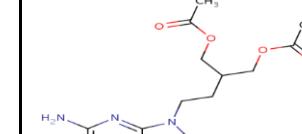
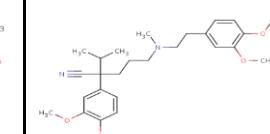
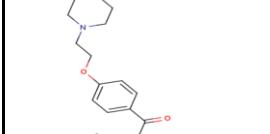
Živila, ki vsebujejo probiotične mikrobe, na Japonskem tržijo že od leta 1920. Prve bakterije, ki so jih uporabili v probiotične namene, so pripadale vrstam *Lactobacillus acidophilus* in *Lactobacillus casei*, katere so bile sestavine fermentiranih mlečnih izdelkov. Danes je število mikrobnih sevov, ki so vključeni v probiotične izdelke silno naraslo, vendar pa fermentirani mlečni izdelki še vedno predstavljajo glavnino probitičnih izdelkov. Probiotične bakterije so vključene tudi v ostale izdelke, kot so različni nefermentirani mlečni izdelki, napitki iz sirotke, skute, siri, sadni sokovi, sadne juhe, pripravki za dojenčke, vključeni pa so tudi v farmacevtske pripravke (Svensson, 1999).

Probiotiki imajo različne mehanizme delovanja, čeprav ti pogosto še niso popolnoma pojasnjeni. Tako so probiotiki sposobni tvorbe bakteriocinov in kratko verižnih maščobnih kislin ter nižanja pH vrednosti v črevesju (Kechagia in sod., 2013). Probiotiki lahko izboljšajo imunski sistem gostitelja. S pričvrstitvijo na epitelne celice preprečijo vezavo drugim, patogenim mikroorganizmom. Prav tako lahko krepijo ali obnavljajo epitelno bariero. Uživanje probiotikov lahko prav tako prepreči drisko ali jo omili, saj driska zmanjšuje število bakterij, zlasti sevov vrst *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* in *Bacteroides*, kar pa pomeni povečanje števila koliformnih bakterij. Probiotični mikroorganizmi lahko izboljšajo nespecifični imunski odziv. Posredno lahko probiotiki vplivajo tudi na aktivacijo limfocitov in spodbudijo tvorbo protiteles (McCracken in Gaskins, 1999).

## 2.5 ZDRAVILNE UČINKOVINE

Zdravilne učinkovine so substance, ki sprožijo v človeškem organizmu določeno reakcijo. V farmacevtski obliki je učinkovina nosilka terapevtskega učinka. Zdravilne učinkovine, katere smo uporabili v praktičnem delu magistrske naloge, so skupaj z njihovimi lastnostmi predstavljene v Preglednici 1.

**Preglednica 1: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin in njihovih lastnosti (DrugBank, 2013).**

Ime	Nitrendipin	Famciklovir	Verapamil	Raloksifen
Tip	majhna molekula	majhna molekula	majhna molekula	majhna molekula
Opis	Zaviralec kalcijevih kanalov, spoudarjenim vazodilatatornim delovanjem. Je antihipertenzjsko sredstvo, ki se od ostalih zaviralcev kalcijevih kanalov razlikuje v tem, da ne zmanjšuje stopnje glomerularne filtracije in je rahlo natriuretičen	Famciklovir je analog gvanina, protivirusno zdravilo, ki se uporablja za zdravljenje različnih virusnih okužb, najpogosteje za herpes zoster (pasovec). Je pred zdravilo penciklovirja z izboljšano biodostopnostjo.	Zaviralec kalcijevih kanalov, ki spada v IV. razred sredstev proti aritmiji.	Druga generacija selektivnih modulatorjev estrogenih receptorjev (selective estrogen receptor modulator, SERM) se uporablja za preprečevanje osteoporoze pri ženskah po menopavzi. Ima estrogen agonistične učinke na kosti in metabolizem holesterola in estrogen antagonistične učinke na mlečne žlezne in maternično tkivo.
Struktura				
Molekulska masa	povprečno: 360,3612 g/mol monoizotop: 360,1321364 g/mol	povprečno: 321,3318 g/mol monoizotop: 321.143704121 g/mol	povprečno: 454.6016 g/mol monoizotop: 454.283157714 g/mol	povprečno: 473.583 g/mol monoizotop: 473.166079047 g/mol

se nadaljuje

**Nadaljevanje Preglednice 1: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin in njihovih lastnosti (DrugBank, 2013).**

Ime	Nitrendipin	Famciklovir	Verapamil	Raloksifen
Kategorija	- antihipertenzično sredstvo - vazodilatatorno sredstvo, - zaviralec kalcijevih kanalov	- protivirusno sredstvo - predzdravilo - nukleozidi in nukleotidi	- vazodilatatorno sredstvo - antiaritmjsko sredstvo - zaviralec kalcijevih kanalov	- antihipokalemično sredstvo - preventivno sredstvo proti osteoporozi - selektivni modulatorji estrogenih receptorjev - antagonist estrogenih receptorjev - sredstvo za ohranjanje gostote kosti
Kemijska formula	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> S
IUPAC ime	3-etil 5-metil 2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat	2-[(acetiloski)metil]-4-(2-amino-9H-purin-9-il) butil acetat	2-(3,4-dimetoksifenil)-5-{{[2-(3,4-dimetoksifenil)etil](metil)amino]-2-(propan-2-il)pentanenitril}	2-(4-hidroksifenil)-3-({{4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenil}karbonil}-1-benzotiofen-6-ol
Razred	Nitrobenzeni	Purini in purinski derivati	Kateholamini in derivati	Halkoni
Indikacija	Za zdravljenje blage do zmerne hipertenzije	Za zdravljenje akutne oblike herpesa zoster (pasavca) in ponovitev genitalnega herpesa, pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom, in zdravljenje ponavljajoče se razjede na sluznicah bolnikov, okuženih z virusom HIV	Za zdravljenje hipertenzije, angine in preventivno za preprečevanje pogostih glavobolov.	Za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze (pri ženskah v menopavzi) in izgube kostne mase zaradi zdravljenja s kortikosteroidi. Tudi za zmanjšanje pojavnosti invazivnega raka na dojkah pri ženskah po menopavzi z osteoporozo, ki so podvržene raku na dojkah.

se nadaljuje

**Nadaljevanje Preglednice 1: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin in njihovih lastnosti (DrugBank, 2013).**

Ime	Nitrendipin	Famciklovir	Verapamil	Raloksifen
Farmakodinamika	<p>Nitrendipin, dihidropiridinski zaviralec kalcijevih kanalčkov, se uporablja samostojno ali skupaj z inhibitorjem angiotenzinske konvertaze za zdravljenje hipertenzije, kronično stabilne angine pektoris in Prinzmetalove oblike angine. Nitrendipin je podoben ostalim perifernim vazodilatorjem. Nitrendipin inhibira dotok zunajceličnega kalcija preko miokardnih in gladko- mišičnih celičnih membran, po možnosti s poškodbo kanalčka, inhibicijo ionsko-nadzorovanih aktivacijskih mehanizmov in/ali z oviranjem sproščanja kalcija iz sarkoplazemskega retikuluma. Zmanjšanje znotrajceličnega kalcija zavira procese krčenja miokardnih gladkih mišičnih celic, povzroča razširitev srčnih in sistemskih arterij, poveča prenos kisika v miokardna tkiva, zmanjša celostno periferno odpornost in zmanjša sistemski krvni tlak.</p>	<p>Famciklovir je prekurzor, kar omogoča hitro biotransformacijo v aktivno proti virusno spojino penciklovir. Penciklovir je protivirusno zdravilo, ki ima zaviralni učinek proti virusu herpes simplex tipa 1 (HSV-1) in 2 (HSV-2) in varicela zoster virusu (VZV). Selektivno blokira sintezo in podvojevanje DNK molekule herpes virusa.</p>	<p>Verapamil je zaviralec kalcijevih kanalčkov tipa-L, ki pa ima tudi antiaritmisko delovanje. R-enantiomerna oblika je bolj učinkovita pri zmanjševanju krvnega pritiska od S-enantiomerne oblike. Vendar pa je S-enantiomer 20-krat učinkovitejši kot R-enantiomer v podaljšanju PR intervala pri zdravljenju motenj srčnega ritma.</p>	<p>Raloksifen, SERM iz benzotiofenskega razreda, ima učinek podoben estrogenkemu na kosti in na presnovo maščob, medtem ko ima antagonističen učinek na prsi in maternično tkivo. Raloksifen se kemično in farmakološko razlikuje od naravno nastalih estrogenov, sintetičnih steroidov in nesteroidnih spojin z estrogenskim učinkom in antiestrogenov. Estrogeni igrajo pomembno vlogo pri reproduktivnem, skeletnem, kardiovaskularnem in centralno-živčnem sistemu pri ženskah in delujejo predvsem preko regulacije genov. Estrogen ob vezavi na receptor spremeni obliko le tega in sproži transkripcijo gena preko specifičnih estrogenskih odzivnih elementov promotorja tarčnega gena. Izguba kostne mase pri ženskah v menopavzi je povezana z zmanjšanim delovanjem jajčnikov in znižanjem ravni estrogena v obtoku. Prav tako imajo estrogeni ugoden vpliv na holesterol v krvi.</p>

se nadaljuje

**Nadaljevanje Preglednice 1: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin in njihovih lastnosti (DrugBank, 2013).**

Ime	Nitrendipin	Famciklovir	Verapamil	Raloksifen
Mehanizem delovanja	Z deformacijo kanalčkov, zaviranjem ionsko-nadzorovanih aktivacijskih mehanizmov in/ali oviranjem sproščanja kalcija iz sarkoplazemskega retikuluma. Nitrendipin inhibira dotok zunajceličnega kalcija preko celičnih membran miokardnih in žilnih gladkih mišic.	V celicah okuženih s HSV-1, HSV-2 in VZV, virusna timidin kinaza fosforilira famciklovir v monofosfatno obliko, iz katere se s pomočjo celične kinaze tvori penciklovir trifosfat. <i>In vitro</i> študije so pokazale, da penciklovir trifosfat inhibira HSV-2 DNK polimerazo primerljivo z deoksigvanozin trifosfatom. Posledično je selektivno inhibirana sinteza in podvojevanje virusne DNK.	Verapamil zavira napetostno odvisne kalcijeve kanalčke. Natančneje, njegov učinek na kalcijeve kanalčke tipa- L v srcu povzroči znižanje ionotrofije in kronotrofije, kar pa povzroči tudi znižanje srčnega utripa in krvnega pritiska. Za mehanizem delovanja verapamila pri pogostih glavobilih se predvideva, povezava z zaviralnim učinkom na kalcijeve kanalčke, vendar pa se še ne ve točno kateri podtip kanalčkov je vključen.	Raloksifen se veže na estrogenske receptorje, ki uravnavajo izražanje več estrogensko-reguliranih genov v različnih tkivih. Raloksifen sproži na kosti učinek podoben estrogenu, zmanjšuje resorpcijo kosti in povečuje mineralno gostoto kosti pri ženskah po menopavzi, kar upočasnuje izgubo kostne mase. Vzdrževanje kostne mase z raloksifenum in estrogeni delno poteka preko nadzorovanja iražanja rastnega faktorja $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$ ), ki je protein kostnega matriksa z antiosteolastičnimi lastnostmi. Raloksifen aktivira TGF- $\beta 3$ po poteh, ki so posredovane z estrogenskim receptorjem in vključujejo DNK zaporedje, za razliko od estrogenskih odzivnih elementov. Zdravilo se veže tudi na receptor estrogena in deluje kot agonist na preosteoklastične celice, kar vodi v zaviranje njihove proliferativne zmožnosti. S tem prispeva h kostni resorpciji. Raloksifen izraža antagonističen estrogenski učinek na tkivo mlečnih žlez in zavira uterotropičen odziv na estrogen. V reproduktivnem tkivu onemogoča prepisovanje genov, ki vsebujejo estrogenski odzivni element. Raloksifen zavira tudi estradiol odvisno proliferacijo človeških mlečnih tumorskih celic » <i>in vitro</i> «. Razlika v delovanju med posmeznimi tkivi ni povsem pojasnjena.

se nadaljuje

**Nadaljevanje Preglednice 1: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin in njihovih lastnosti (DrugBank, 2013).**

Ime	Nitrendipin	Famciklovir	Verapamil	Raloksifen
<b>Metabolizem</b>	ni podatka	jetrni	ni podatka	jetrni
<b>Toksičnost</b>	ni podatka	Simptomi prevelikega odmerka vključujejo zaprtje, drisko, omotico, utrujenost, povišano telesno temperaturo, glavobol, slabost in bruhanje	LD <sub>50</sub> =8 mg/kg (podatek pri miškah)	ni podatka
<b>Razpolovna doba</b>	ni podatka	10 ur	2,8-7,4 ure	27,7 ur
<b>Lipofilnost molekule (log P)</b>	2,88	0,6	3,79	5,2

### **3 MATERIALI IN METODE**

Laboratorijsko delo v okviru magistrske naloge je zajemalo tri sklope dela.

I. Mikrobiološki del:

Bakterijske kulture smo razmazali na trdno gojišče MRS in inkubirali, da so izrasle posamezne kolonije. Te smo uporabili za pripravo prekonočne kulture v tekočem gojišču. Prekonočno kulturo smo precepili v sveže gojišče in inkubirali do želene optične gostote. Nato smo kulturam dodali zdravilno učinkovino. Po dodatku zdravilne učinkovine smo kulture inkubirali še eno uro. Sledila je filtracija, supernatant smo odstranili in shranili v zamrzovalni skrinji pri temperaturi -20 °C do analize.

II. Analitski del:

Shranjene vzorce smo odmrznili in jih pripravili za analizo. Sledila je analiza s pomočjo LC-MS/MS metode.

III. Statistični del:

Dobljene rezultate smo predstavili v grafični obliki. S statističnimi testi v računalniškem programu GraphPad Prism 6 smo rezultatom določili signifikanco in stopnjo signifikance.

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Bakterijski sevi

V raziskovalnem delu smo uporabili 10 sevov mlečnokislinskih bakterij rodu *Lactobacillus*:

- *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842),
- *Lactobacillus casei* (*Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393),
- *Lactobacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DSM 5622),
- *Lactobacillus gasseri* (ATCC 20243),
- *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014),
- *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55730),
- *Lactobacillus salivarius* (LMG 9477),
- *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103),
- *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 3456),
- *Lactobacillus gasseri* K7(CCM 7710).

Vsi sevi so shranjeni na Odseku za biotehnologijo na Institutu »Jožef Stefan«, prejeli pa smo jih iz zbirke mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike Biotehniške fakultete.

#### 3.1.2 Trdno in tekoče gojišče MRS

V postopku testiranja sevov smo uporabili trdno in tekoče gojišče MRS. Gojišča smo pripravili po naslednjem postopku:

Po navodilih proizvajalca smo odtehtali 52,2 g gojišča MRS (Merck) in dolili destilirano vodo do 1000 ml. Gojišče smo premešali na magnetnem mešalu tako, da smo dobili bistro raztopino. V primeru priprave trdnega gojišča smo dodali 15 g agarja (Sigma). Sledila je sterilizacija gojišča v avtoklavu pri temperaturi 121 °C, nadtlaku 1 bar za 20 min. Gojišče, ki smo mu dodali agar smo po sterilizaciji ohladili na magnetnem mešalu na približno 50 °C in razlili v petrijeve plošče. Plošče z gojiščem smo pustili v laminariju, da se je gojišče popolnoma strdilo. Plošče s trdnim gojiščem smo nato shranili v hladni sobi na 4 °C do uporabe in sicer ne dlje kot 30 dni. Po približno 30 dneh smo stare plošče zavrgli in pripravili nove. Tekoče gojišče pa smo po sterilizaciji shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

### 3.1.2.1 Trdno MRS gojišče

Trdno gojišče MRS smo uporabili za prvo nacepitev/oživitev bakterij.

**Preglednica 2: Sestavine trdnega gojišča MRS**

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
MRS	52,2	Merck
Agar	15,0	Sigma
destilirana voda	do 1000 ml	

\*Sterilizacija je potekala 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1 bar.

### 3.1.2.2 Tekoče MRS gojišče

Tekoče gojišče MRS smo uporabili za pripravo prekonočnih kultur, delovnih kultur in za redčenje vzorca pri merjenju optične gostote (OD).

**Preglednica 3: Sestavine tekočega gojišča MRS**

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
MRS	52,2	Merck
destilirana voda	do 1000 ml	

\* Sterilizacija je potekala 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1 bar.

### 3.1.3 Zdravilne učinkovine

V Preglednici 4 so predstavljene vse zdravilne učinkovine, katere smo dodali kulturam bakterij, ko so dosegli optično gostoto OD ~ 2,0. Vsaka zdravilna učinkovina je bila dodana bakterijskim kulturam ločeno.

**Preglednica 4: Pregled uporabljenih zdravilnih učinkovin**

Zdravilna učinkovina	Koncentracija v gojišču [µg/ml]
raloksifen	5
nitrendipin	5
verapamil	5
famciklovir	5

### 3.1.4 Pufri za umerjanje pH metra

Pufri za umerjanje pH metra so predstavljeni v Preglednici 5.

**Preglednica 5: Pregled uporabljenih pufrov**

Pufer	Proizvajalec
pufer za umerjanje 4,01	Metler-Toledo, AG
pufer za umerjanje 9,21	Metler-Toledo, AG
pufer za umerjanje 7,00	Metler-Toledo, AG

### 3.1.5 Aparature in ostala laboratorijska oprema

V Preglednici 6 je predstavljena vsa laboratorijska oprema in naprave, katere smo uporabili pri svojem delu.

**Preglednica 6: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili med poskusom**

Oprema	Tip, proizvajalec
tehnicka	200A, Tehnica
avtoklav	
petrijeve plošče	
zobotrebci	
vrtinčasto mešalo (vortex)	Vibromix 10, Tehnica
inkubator (37 °C)	Binder
kivete	biorad
spektrofotometer	Lambda Bio +, PerkinElmer
centrifuge	SorvallRC5C PLUS
brizge	Rotanda 460 R, Hettich
filter 0,2 µm	10ml, brand
pipete	Minisart, Sartorius Stedim
zamrzovalna skrinja	Eppendorf
LC/MS/MS	Agilent 1290 Infinity LC + Agilent 6460 MSD
brezprašna komora	Labcaire
magnetno mešalo	Rotamix SHP-10, Tehnica
pH meter	SevenEasy, Mettler Toledo
epruvete velike	
epruvete male	
epruvete s stransko	
cevko	
laboratorijske steklenice	

**Nadaljevanje Preglednice 6: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili med poskusom**

Oprema	Tp, proizvajalec
plinski gorilnik	
parafilm	
kovinska eza za precepljanje	
steklene viale	
papirnate brisače	Paloma

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Oživljanje bakterij s cepljenjem zamrznjene kulture na trdno gojišče MRS

Sevi so bili do uporabe shranjeni v delovni zbirki v zamrzovalni skrinji na -80 °C. Mikrocentrifugirko s sevom smo vzeli iz zbirke in jo postavili na led. Tako smo preprečili neželeno odtajanje zamrznjene kulture, saj bi to lahko povzročilo poškodbe ali odmiranje celic ob ponovnem zamrzovanju. Mikrocentrifugirko smo nato ob plinskem gorilniku sterilno odprli. S vročo ezo smo iz mikrocentrifugirke odvzeli del kulture in jo razmazali na trdno gojišče MRS. Mikrocentrifugirko smo po odvezmu kulture zaprli in prenesli nazaj v zamrzovalno skrinjo na -80 °C. Nacepljene agarne plošče smo zavili s parafilmom, jih inkubirali 3 dni pri temperaturi 37 °C, da so izrasle kolonije, nato pa shranili v hladilniku.

### 3.2.2 Priprava prekonočnih kultur

V epruvete smo sterilno prelili 5 ml tekočega gojišča MRS. Petrijeve plošče z izraslimi kolonijami smo ob plinskem gorilniku sterilno odprli ter poiskali posamezne kolonije. V tekoče gojišče MRS smo prenesli eno samo izraslo kolonijo določenega seva. Za prenos kolonije iz trdnega gojišča v tekoče gojišče smo uporabili sterilni zobotrebec in pinceto. Prenos kolonije iz trdnega v tekoče gojišče je potekal v sterilnem okolju ob plinskem gorilniku. Z zobotrebcem, katerega smo na enem koncu držali s sterilno pinceto, smo se dotaknili osamljene kolonije in jo prenesli v epruveto s tekočim gojiščem MRS. Vsebino epruvete smo premešali na vrtinčnem mešalniku. Nacepljena tekoča gojišča smo nato čez noč inkubirali na 37 °C.

### **3.2.3 Priprava delovne kulture**

Prekonočno kulturo smo uporabili kot inokulum za pripravo delovne kulture. Od količine oziroma koncentracije inokuluma je odvisna hitrost in čas rasti bakterijske kulture. Inokulum smo nacepili v tekoče gojišče MRS ob redčitvi 1:100 in 1:20. Tako smo v 10 ml gojišča MRS nacepili 100 µl oziroma 500 µl prekonočne kulture. Nacepljene bakterijske kulture smo nato gojili pri temperaturi 37 °C in spremljali čas, da se je mikrobnja populacija namnožila do vrednosti optične gostote OD ~ 2. Za nadaljnje delo smo uporabili redčitev, pri kateri so bakterijske kulture zrasle do optične gostote OD ~ 2 v sprejmljivem času (približno 8 ur).

### **3.2.4 Nacepitev in gojenje delovne kulture**

Za pripravo delovne kulture smo tekoče gojišče MRS cepili s prekonočno kulturo v redčitvi 1:20. Majhne epruvete s prekonočno kulturo smo premešali na vrtinčnem mešalu (vortex), da smo dobili homogeno zmes. Nato smo pripravili velike epruvete s po 10 ml tekočega gojišča MRS. Tekoče MRS gojišče smo pipetirali v epruvete sterilno ob ognju plinskega gorilnika. Nato smo odpipetirali 500 µl prekonočne kulture v 10 ml tekočega gojišča MRS, premešali na vrtinčnem mešalu in zložili na stojalo. Delovne kulture sevov smo pripravili v treh paralelkah zaradi ugotavljanja ponovljivost znotraj posameznega seva. Nacepljena gojišča smo nato inkubirali na 37 °C. Ker smo vsem kulturam sevov želeli dodati zdravilno učinkovino pri enakih pogojih, saj le tako lahko delamo primerjavo med njimi, smo vse gojili do optične gostote OD ~ 2,0.

### 3.2.5 Merjenje optične gostote s spektrofotometrom

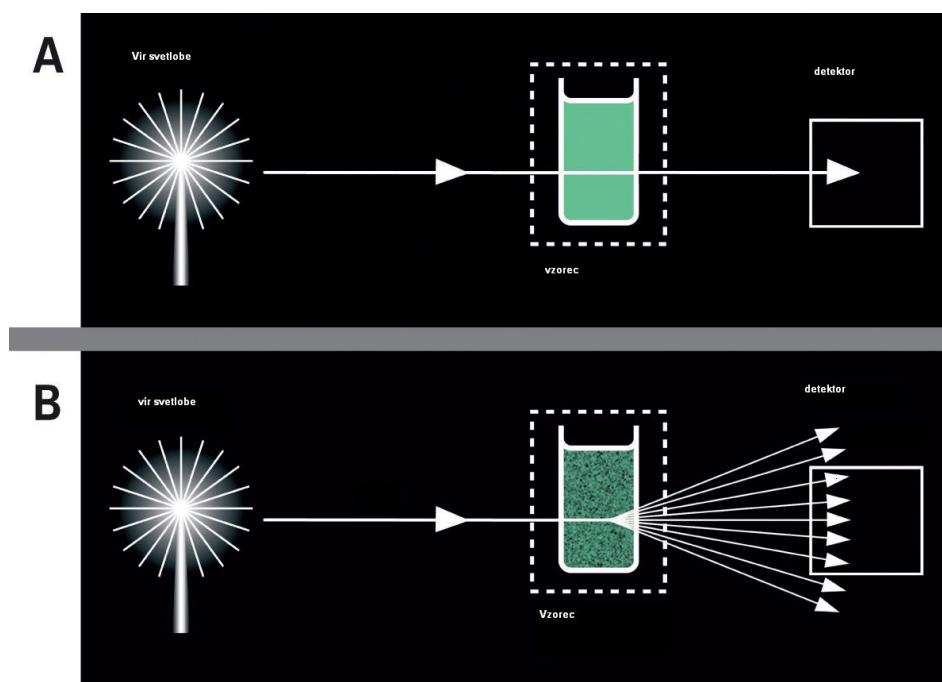
#### 3.2.5.1 Priprava vzorca

Merjenje optične gostote je potekalo s spektrofotometrom PerkinElmer Lambda BIO pri valovni dolžini 600 nm. Optično gostoto kultur sevov smo merili med inkubacijo in sicer vsakih 30 min. Epruvete s kulturami posameznih sevov smo vzeli iz inkubatorja in vsebino premešali na vrtinčnem mešalu. Iz epruvete smo v brezprašni komori vzeli 200 µl vzorca in ga prenesli v kiveto. Pri nalivanju tekočin v kivete smo bili pozorni, da se nismo dotikali označenih ploskev, saj bi s tem umazali ploskev in meritev ne bi bila pravilna. V kiveto smo dodali še 600 µl svežega tekočega gojišča MRS ter dobro premešali. Tako smo vzorec 4-krat redčili. Pred meritvijo je potrebno spektrofotometer ustrezno pripraviti. Za spremeljanje rasti mikrobne populacije se običajno uporablja svetloba valovne dolžine 600 nm. Tako je potrebno spektrofotometer najprej nastaviti na ustrezno valovno dolžino. Nato je potrebno posneti slepi vzorec, s katerim primerjamo izbrane vzorce. V našem primeru smo kot slepi vzorec uporabili 800 µl svežega tekočega gojišča MRS, katerega smo nalili v svežo kiveto. Kiveto napolnjeno samo z gojiščem MRS smo vstavili v spektrofotometer in izmerili optično gostoto. Izmerjeno vrednost smo naravnali na vrednost 0, kar je služilo kot referenčna vrednost. Nato smo v spektrofotometer vstavili kiveto s posameznim vzorcem in ponovno izmerili vrednost optične gostote. Spektrofotometer primerja izmerjeno vrednost vzorca z referenčno vrednostjo. Glede na to, da je bil posamezen vzorec v kiveti 4-krat redčen, smo izmerjeno vrednost pomnožili s 4 in dobili dejansko vrednost optične gostote vzorca. Gojenje sevov smo prekinili, ko je mikrobna populacija dosegla optično gostoto približno OD = 0,500.

#### 3.2.5.2 Princip merjenja optične gostote

Pri merjenju optične gostote gre v osnovi za merjenje razprtene svetlobe, ki nastane pri obsevanju bakterijskih celic z virom svetlobe. Svetloba, ki se ne razprši, preide do detektorja. To se predstavi kot meritev absorbance. Gostota bakterijskih celic vpliva na količino razprtene svetlobe in na količino svetlobe, ki preide do detektorja. Posledično je absorbanca sorazmerna z gostoto in koncentracijo vzorca ter hkrati obratno sorazmerna prepustnostjo. Matlock in sod., 2011).

Osnovni princip potovanja svetlobe skozi vzorec in absorbance je prikazan tudi na Sliki 1.



Slika 1: Prikaz sisanja svetlobe v spektrometriji (Matlock in sod., 2011).

**A:** vzorec brez sisanja svetlobe, dušenje svetlobe med svetlobnim virom in detektorjem povzroča absorbanco svetlobe v vzorcu; **B:** vzorec s sisanjem svetlobe (npr. bakterijska kultura), svetlobno doseganje detektorja je še dodatno znižano zaradi sisanja svetlobe, to znižanje svetlobnega doseganja detektorja ustvari iluzijo povišanja absorbance vzorca

### 3.2.6 Dodatek zdravilne učinkovine in koinkubacija bakterijske kulture z zdravilno učinkovino

Ko je bakterijska kultura dosegla optično gostoto OD  $\sim 2,0$ , smo ji dodali posamezno zdravilno učinkovino. Posameznim sevom proučevanih laktobacilov smo ločeno dodali zdravilne učinkovine raloksifen, verapamil, nitrendipin in famciklovir. Končna koncentracija zdravilne učinkovine v gojišču z bakterijsko kulturo je bila  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Dodatek zdravilne učinkovine gojišču z bakterijsko kulturo je potekal v sterilnem okolju v brezprašni komori. V epruveto z gojiščem smo s pipeto dodali  $100 \mu\text{l}$  zdravilne učinkovine iz založne raztopine. Založne raztopine zdravilnih učinkovin so bile do uporabe shranjene v hladilniku, ker so pri višjih temperaturah nestabilne. Po dodatku zdravilne učinkovine smo epruveto sterilno zaprli, premešali na vrtinčnem mešalu in postavili v inkubator na  $37^\circ\text{C}$ . Koinkubacija zdravilne učinkovine z bakterijsko kulturo je trajala 1 h.

### **3.2.7 Ločevanje supernatanta od trdnega dela brozge in shranjevanje vzorcev**

Po koinkubaciji zdravilne učinkovine z bakterijsko kulturo smo analizirali samo spojine, ki so se nahajale oz. so se izločile v gojišče (ekstracelularna vsebina) med tem, ko intracelularne vsebine bakterij nismo analizirali. Zato smo morali brozgo ločiti na trdni in tekoči del. To smo storili v dveh korakih, in sicer s centrifugiranjem in s filtracijo skozi 0,22 µm filter.

Po koinkubaciji sevov bakterijskih kultur z zdravilnimi učinkovinami smo epruvete z brozgami prenesli v brezprašno komoro. Tu smo brozgo sterilno prelimi v plastične epruvete in jih tesno zaprli s plastičnimi zamaški. Sledil je prvi del ločevanja tekočega dela brozge od trdnega in sicer s centrifugiranjem. Centrifugiranje je potekalo v centrifugi Hettich Rotanda 460 R ali v centrifugi SorvallRC5C PLUS. Brozge smo centrifugirali 10 min pri 4000 obr/min in pri temperaturi 4 °C. Nizka temperatura med centrifugiranjem je pomembna, da preprečimo morebitno razpadanje nastalih produktov, ki so nastali v brozgi in so neobstojni pri višjih temperaturah. Po centrifugiranju smo supernatant odlili v 10 ml injekcijske brizge, katere so imele na spodnji strani pritrjen 0,22 µm filter MiniSart. S filtracijo smo iz supernatanta odstranili še morebitne preostale bakterijske celice, ki se med centrifugiranjem niso posedle ali pa so se med odlivanjem v injekcijsko brizgo iz peleta izločile v supernatant. Odstranjevanje bakterijskih celic iz brozge je predvsem pomembno zaradi nadaljnje analize na masnem spektrometru, kjer lahko trdni delci prikažejo lažen rezultat ali pa celo zamašijo aparaturo.

Supernatante vzorcev smo do analize shranili na -20 °C.

### **3.2.8 Odstranjevanje ostankov vzorcev in ostalega uporabljenega materiala**

Po centrifugiranju in filtriranju smo epruvete s peletom dali v posebno vrečko za odpad. Prav tako smo v to vrečko dali injekcijske brizge skupaj z 0,22 µm filtri in vse uporabljene nastavke za pipetiranje. Te vrečke smo dali v večjo vrečo, katera je namenjena za odpadke. Ti odpadki se avtoklavirajo, preden se odvržejo v smeti.

Steklene epruvete, v katerih je potekala priprava delovnih kultur in majhne epruvete s ostanki prekonočnih kultur, smo avtoklavirali. Steklovino s preostaolimi bakterijami smo skrbno označili z vrsto bakterije, količino in poreklom. Tako smo zagotovili, da je bila steklovina z bakterijskimi kulturami pravilno avtoklavirana. Steklene epruvete so nato pomili in ponovno sterilizirali za vnovično uporabo.

### **3.2.9 Določanje rastne krivulje proučevanih sevov laktobacilov**

Vzporedno z nacepitvijo gojišča MRS za pripravo delovne (3.2.4 Nacepitev in gojenje delovne kulture) smo prekonočne kulture (3.2.2 Nacepitev prekonočne kulture) nacepili še v 10 ml tekočega gojišča MRS v epruvete s stransko cevko. Tudi te epruvete smo inkubirali v inkubatorju na 37 °C. Postopek gojenja posameznega seva v epruvetah s stransko cevko je bil enak kot pri navadnih epruvetah (postopek je opisan v točki 3.2.4 Nacepitev in gojenje delovne kulture). Tekom gojenja smo večkrat izmerili optično gostoto kulture. Merjenje optične gostote se je tu nekoliko razlikovalo od merjenja optične gostote pri navadnih epruvetah (3.2.5.1 Priprava vzorca). Tu smo namreč izvajali meritve brez odvzemanja vzorca in brez posega v brozgo. Optično gostoto smo tako merili direktno v epruveti. Pri tem smo vsebino epruvete s stransko cevko premešali na vrtinčnem mešalu tako, da smo dobili homogeno zmes. Nato smo epruveto rahlo nagnili in s tem omogočili, da se je del brozge pretočil v stransko cevko. Epruveto smo s stransko cevko navzdol postavili v spektrofotometer v odprtino za kivete. Za uspešno meritev optične gostote je pomembno, da je stranska cevka na epruveti vstavljena čim bolj navpično. Prav tako se epruveta s stransko cevko med merjenjem optične gostote ne sme premikati, saj bi bila lahko meritev nepravilna. Optično gostoto smo tudi za določanje rastne krivulje merili pri valovni dolžini 600 nm. Prav tako pa smo pred začetkom meritev spektrofotometer naravnali na vrednost 0 s slepim vzorcem. Slepí vzorec je tudi v tem primeru predstavljalo tekoče gojišče MRS, katerega smo zaradi lažje primerljivosti natočili v epruveto s stransko cevko.

Meritve smo izvajali v različnih časovnih intervalih od začetka gojenja, zanimalo pa nas je predvsem, koliko časa potrebuje posamezen sev, da mikrobnna populacija zraste do optične gostote OD ~ 2,0, pri kateri smo prenehali z meritvami. Zaradi statistične primerljivosti smo posamezen sev gojili vzporedno v dveh paralelkah.

### 3.2.10 Merjenje pH vrednosti

Pred koinkubacijo proučevanih sevov z različnimi zdavilnimi učinkovinami smo vzorcem izmerili pH vrednosti. Za merjenje pH vrednosti smo uporabili vzorce, ki so bili namenjeni za določanje rastne krivulje iz točke 3.2.9 Določanje rastne krivulje, ko so le ti dosegli optično gostoto OD = 2,0. Vrednost pH smo merili s pH metrom Metler Toledo, SevenEasy. Pred merjenjem pH vrednosti kulture, je potrebno pH meter umeriti. S tem povežemo vrednosti izmerjene s pH metrom z njihovimi realnimi vrednostmi. pH meter smo umerili v 3 točkah, in sicer pri vrednostih 4,01, 9,21 in 7,00. Umerjanje pH metra je potekalo po protokolu kot ga je predvidel proizvajalec pH metra.

Po umeritvi pH metra smo merili pH vrednosti vzorcev ter gojišča MRS brez bakterij. Po meritvi posameznega vzorca smo pH elektrodo vedno sprali s destilirano vodo in jo obrisali v papirnate brisače. Tako smo dosegli pravilne meritve pH vrednosti posameznih vzorcev, saj na pH elektrodi ni bilo ostankov predhodnega vzorca, ki bi lahko vplival na meritve. Po končanih meritvah smo pH elektrodo pustili v 3M KCl.

### 3.2.11 Analiza vzorcev z LC-MS/MS

Vzorce, ki so bili po centrifugiranju shranjeni na -20 °C (3.2.7.2 Ločevanje trdnega in tekočega dela brozge), smo nekaj časa pustili stati na sobni temperaturi, da so se odtalili. Nato smo 1 ml posameznega vzorca iz plastične epruvete prenesli v steklene viale, katere smo ustrezno označili. Viale smo zaprli s plastičnimi zamaški, ki imajo na vrhu gumo, katera je namenjena za odvzem vzorca med analizo. V analizo smo vključili tudi kontrolo, kjer je bila posamezna zdravilna učinkovina dodana v sterilno gojišče MRS. Vzorce smo analizirali s tekočinskim kromatografom, zaporedno povezanim z masnim spektrometrom. Analize so potekale na Fakulteti za farmacijo.



Slika 2: Naprava LC-MS/MS (Velika..., 2014)

### 3.2.11.1 Princip delovanja LC-MS/MS

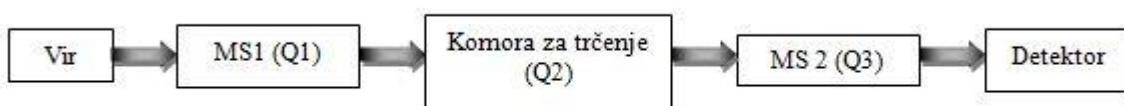
V klinični praksi so skoraj vsi masni spektrometri (mass spectrometer, MS) samostojni ali tandemski modeli selektivnih masnih filtrov (prepuščajo le ione) – kvadropol (quadrupole, Q), pred katerim je bodisi plinska kromatografija (gas chromatography, GC) ali tekočinska kromatografija (liquid chromatography, LC). Tandemski MS je sestavljen iz LC na začetku in specifičnega trojnega kvadropolnega (običajno imenovan kar tandemski) masnega spektrometra. LC-MS/MS je merilna naprava, ki v zadnjih petnajstih letih postopoma nadomešča GC-MS in LC z enojnim kvadropolnim detektorjem masnega spektrometra (LC-MS). Tandemski masni spektrometer predstavlja danes večino merilnih naprav v kliničnih laboratorijih (Grebe in Singh, 2011).

Masni spektrometer je naprava, ki meri razmerje med maso in nabojem pri vseh nabitih delcih (skrajšano m/Q, m/q, m/Z ali m/z). V obliki za uporabo v analizi bioloških vzorcev sestoji iz štirih osnovnih komponenet:

1. naprava za dovajanje vzorca, ki posreduje pri prehodu biološkega vzorca iz trdnega oz tekočega stanja v plinasto – temeljni pogoj za vse nadaljnje korake masne analize,
2. naprava za ionizacijo, ki ionizira vaporizirane biološke vzorce,
3. ionska pot, ki prenese ione iz skoraj atmosferskega tlaka vira biološkega vzorca v visoki vakuum dejanskega masnega analizatorja in jih premakne k detektorju, ki jih ločuje glede na njihovo m/Q,
4. ionski detektor za prepoznavo in kvantifikacijo ionov.

(Grebe in Singh, 2011).

Na Sliki 3 je shematsko predstavljeno delovanje LC/MS/MS.



Slika 3: Shematski prikaz delovanja LC-MS/MS (Grebe in Singh, 2011:3)

Naprava LC-MS/MS sestoji iz:

- vira ionizacije pri atmosferskem tlaku – običajno so to elektroionizacija (electroionisation, EI), elektroionizacija z razprševalcem (electrospray ionization, ESI), atmosfersko-tlačna kemijska ionizacija (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI), matrično posredovana laserska desorpacija/ionizacija (matrix assisted laser desorption/ ionization, MALDI),
- komponente za vstop in osredotočanje ionov, ki zagotavlja tako prehod ionov iz atmosferskega tlaka v vakuum, kot tudi osredotočanje ionov,
- prve naprave za masno filtriranje (Q1 na Sliki 3),
- komore za trčenje (colision chamber – Q2 na Sliki 3), ki je lahko napolnjena z nizkotlačnim plinom za disociacije inducirane s trčenjem (collision-induced dissociation, CID),
- druge naprave za masno filtriranje (Q3 na Sliki 3),
- detektorja ionskega učinka

(Grebe in Singh, 2011).

Vzorec potuje iz LC do masnega spektrometra. Analiza vzorca poteka v dvostopenjskem masnem spektrometru, ki je povezan z reakcijsko (fragmentacijsko) komoro. Prva stopnja masnega spektrometra je postavljena/kalibrirana tako, da prepozna specifično maso molekule. Ta molekula nato preide v reakcijsko/fragmentacijsko komoro, kjer pride do fragmentacije. Fragmenti nato potujejo do druge stopnje masnega spektrometra, ki identificira hčerinske/produktne ione (Tobin in sod., 2010).

Trojni kvadropolni masni spektrometer (QQQ) zagotavlja najbolj občutljivo obliko kvantifikacije, s pomočjo fragmentacije analitskega prekurzorskega iona, ki ustreza ionu z najvišjim odzivom med produkcijskimi ioni (quantifier ion). Ta prehod je znan kot večkratno spremeljanje reakcije (multiple reaction monitoring, MRM). S pridobivanjem dodatnega signala, ki ustreza naslednjemu ionu z najvišjim signalom (qualifier ion), lahko pridobimo dovolj informacij za potrditev iskane spojine. Identitetu spojine lahko potrdimo, če je razmerje med signaloma dveh produkcijskih ionov med kalibracijskim standardom in neznanim vzorcem enako. Pri vsakem analitu se merita tako quantifier kot tudi qualifier ion, z zahtevo, da mora biti razmerje qualifier/quantifier znotraj  $\pm 20\%$ , da lahko potrdimo prisotnost analita v vzorcih. Z uporabo QQQ za pridobitev MRM signalov za iona qualifier in quantifier lahko kvantifikacijo in potrditev spojine izvajamo sočasno (Mohsin in sod, 2007).

### 3.2.12 Statistična obdelava rezultatov

Rezultate iz LC-MS/MS smo grafično obdelali s pomočjo programov Microsoft Excel 2010 in GraphPad Prism 6. S pomočjo programa Microsoft Excel 2010 smo vsebnosti uredili v preglednice. Program GraphPad Prism 6 pa je služil za grafično obdelavo rezultatov in za izdelavo statističnih testov. Vsebnosti posamezne spojine v vzorcih smo analizirali s pomočjo t-testa pri 95 % intervalu zaupanja, ki nam je služil pri preverjanju signifikance, in ANOVA testa, s katerim smo določi stopnjo signifikance in pridobili podatke o variabilnosti med vsemi vzorci po koinkubaciji z določeno zdravilno učinkovino.

Po ANOVA testu smo pridobili naslednje vrednosti:

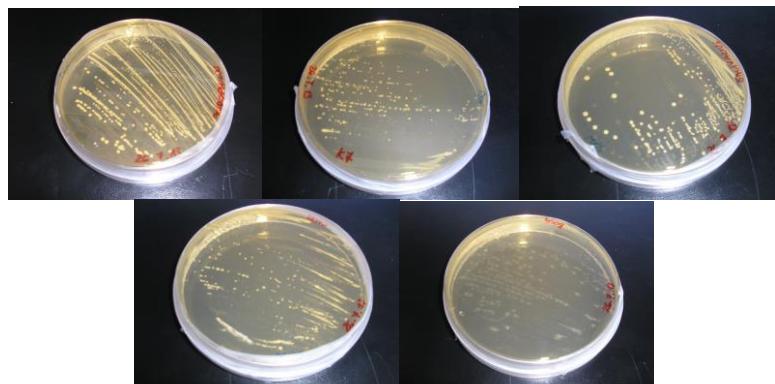
- p – vrednost (če je p vrednost nizka pomeni, da se aritmetične sredine razlikujejo oz., da se najmanj ena aritmetična sredina razlikuje od ostalih, če pa je p vrednost velika pa pomeni, da se aritmetične sredine ne razlikujejo oz. nimamo prepričljivih dokazov, da se aritmetične sredine razlikujejo);
- F- vrednost, ki nam poda podatek o varianci med sevi (v kolikor je varianca med sevi naključna, potem pričakujemo vrednost F okoli 1,0, v kolikor pa je varianca večja od naključno pričakovane, pa je F vrednost precej višja);
- stopnja signifikance nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne; (označeno z zvezdico (\*), pri čemer število zvezdic pove stopnjo signifikance; \*\*\* = ekstremno signifikantna razlika ( $p < 0,001$ ), \*\* = velika signifikantna razlika ( $0,001 < p < 0,01$ ), \* = signifikantna razlika ( $0,01 < p < 0,05$ ), X = nesignifikantna razlika ( $p > 0,05$ ));
- $R^2$  – vrednost, ki je del celotne variance in se nanaša na povprečja skupin.  $R^2$  – vrednost primerja variabilnost povprečij med skupinami z variabilnostjo znotraj skupin (velika  $R^2$  vrednost pomeni, da je velik del variacije povezan z obdelavo, ki določa skupine).

(GraphPad..., 2014).

## 4 REZULTATI

### 4.1 OŽIVLJANJE SEVOV IN IZGLED KOLONIJ

Plošče s trdnim gojiščem MRS smo nacepili z 10 sevi mlečnokislinskih bakterij rodu *Lactobacillus*, in sicer vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*, *Lb. gasseri* (2 sevi), *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. bulgaricus* in *Lb. paracasei*. Pri vseh sevih smo opazili rast kulture, kar pomeni, da so bili vsi sevi živi. Prav tako smo pri vseh sevih opazili posamezne kolonije. Število posameznih kolonij je bilo pri posameznih sevih različno. Nekateri sevi so tvorili zelo velike in obarvane kolonije (seva vrst *Lb. acidophilus* in *Lb. salivarius*) nekateri pa so po inkubaciji tvorili zelo majhne in skoraj prozorne kolonije (sev vrste *Lb. bulgaricus*). Primer razmazov sevov in izraslih kolonij na trdnem gojišču MRS po inkubaciji pri 37 °C, so prikazani na Sliki 4.



Slika 4: Izrasle kolonije sevov laktobacilov na trdnem gojišču MRS po inkubaciji pri 37 °C (od leve proti desni sevi vrst: *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri* (K7), *Lb. salivarius*, *Lb. casei*, *Lb. bulgaricus*)

## 4.2 IZGLED PREKONOČNIH KULTUR

Po inkubaciji sevov v tekočem gojišču MRS na 37 °C, smo epruvete s prekonočnimi kulturami primerjali med seboj in ugotovili, da sevi različno hitro rastejo. Bakterijska kultura je bila v epruvetah različno razporejena. Pri sevih, ki so rasli počasneje inkubacijo podaljšali na 48 ur.

Kulture različnih sevov po 24 in 48 urah inkubacije so prikazani na Slikah 5a in 5b.



5a)



5b)

Slika 5: Sevi vrst *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. salivarius*, *Lb. gasseri* (K7) in *Lb. acidophilus*

5a: po 24 urah, 5b: po 48 urah gojenja.

Prekonočne kulture sevov smo pregledali in opisali. Opisi kultur so zbrani v Preglednici 7.

Preglednica 7: Opisi kultur sevov *Lactobacillus* v tekočem gojišču MRS po inkubaciji pri 37 °C

Sev vrste	Oborina celic	Videz kulture po inkubaciji	Oblika in struktura kulture	Gostota kulture po 24 urah	Gostota kulture po 48 urah
<i>Lb. bulgaricus</i>	Večina kulture se je posedla na dno epruvete	Rahlo motno po celotni prostornini	Rahla in kosmičasta kultura	skoraj nič biomase	veliko biomase
<i>Lb. casei</i>	Vsa kultura se je posedla na dno epruvete	Povsem bistro	Gosta in trdna kultura	malo biomase	veliko biomase
<i>Lb. salivarius</i>	Vsa kultura se je posedla na dno epruvete	Povsem motno	Kosmičasta kultura	zelo veliko biomase	zelo veliko biomase
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	Večina kulture se je posedla na dno epruvete	Ob gladini bistro, proti dnu vse bolj motno	Trdna kultura	malo biomase	veliko biomase
<i>Lb. acidophilus</i>	Vsa kultura se je posedla na dno epruvete	Ob gladini bistro, proti dnu epruvete motno, zelo viskozno	Kosmičasta kultura	skoraj nič biomase	veliko biomase
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	Večina kulture se je posedla na dno epruvete	Povsem motno	Kultura tvori skupke	veliko biomase	zelo veliko biomase
<i>Lb. paracasei</i>	Večina kulture se je posedla na dno epruvete	Motno	Trdna kultura	malo biomase	veliko biomase
<i>Lb. reuteri</i>	Večina kulture se je posedla na dno epruvete	Povsem motno	Trdna kultura	veliko biomase	zelo veliko biomase
<i>Lb. plantarum</i>	Večina kulture se je posedla na dno epruvete	Povsem motno	Trdna kultura, tvori kepo	veliko biomase	zelo veliko biomase
<i>Lb. rhamnosus</i>	Vsa kultura se je posedla na dno epruvete	Pri gladini povsem bistro, proti dnu epruvete motno	Kosmičasta kultura	veliko biomase	zelo veliko biomase

#### 4.3 DOLOČITEV KOLIČINE INOKULUMA PREKONOČNE KULTURE ZA PRIPRAVO DELOVNE KULTURE

Delovnim kulturam smo želeli dodati posamezno zdravilno učinkovino ob približno enakih pogojih (OD ~ 2,0). To smo želeli doseči v sprejemljivem času, približno osmih ur. Ker smo predvidevali, da vsi sevi ne rastejo enako hitro, smo morali najprej določiti ustrezno količino inokuluma.

Količino vcepka smo določili s sevom *Lb. gasseri* ATCC 20243 in *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* DSM 5622. Hitrost rasti izbranih sevov smo testirali pri dveh količinah inokuluma. V epruvete z 10 ml tekočega MRS gojišča smo tako nacepili 100 µl (redčitev 1:100) in 500 µl (redčitev 1:20) prekonočne kulture enega od sevov. Optično gostoto vzorcev smo merili po 4,5, 6,5 in 23 h inkubacije pri 1 % inokulumu prekonočne kulture in po 4,5 ter 7,5 h pri 5 % inokulumu. Rezultati meritev so prikazani v Preglednicah 8 in 9.

**Preglednica 8:** Optične gostote kultur sevov vrst *Lb. gasseri* (ATCC 20243) in *Lb. paracasei* po 4,5, 6,5 in 23 urah inkubacije na 37 °C pri nacepitvi 100 µl prekonočne kulture v gojišče MRS (n=3).

Sev vrste	OD <sub>600</sub>		
	4,5 h	6,5 h	23 h
<i>Lb. gasseri I</i>	0,236	0,612	5,100
<i>Lb. gasseri II</i>	0,232	0,596	4,496
<i>Lb. gasseri III</i>	0,264	0,600	4,468
<i>Lb. paracasei I</i>	0,44	0,932	4,700
<i>Lb. paracasei II</i>	0,448	0,916	4,556
<i>Lb. paracasei III</i>	0,436	0,976	4,720

n= število paralelk

**Preglednica 9:** Prikaz izmerjene optične gostote treh paralelk sevov *L. gasseri* (ATCC 20243) in *L. paracasei* po 4,5 in 7,5 urah inkubacije na 37 °C pri nacepitvi 500 µl prekonočne kulture v delovno kulturo

Sev vrste	OD <sub>600</sub>	
	4,5 h	7,5h
<i>Lb. gasseri I</i>	0,852	1,632
<i>Lb. gasseri II</i>	0,772	1,656
<i>Lb. gasseri III</i>	0,832	1,616
<i>Lb. paracasei I</i>	1,524	2,148
<i>Lb. paracasei II</i>	1,284	1,656
<i>Lb. paracasei III</i>	1,252	1,836

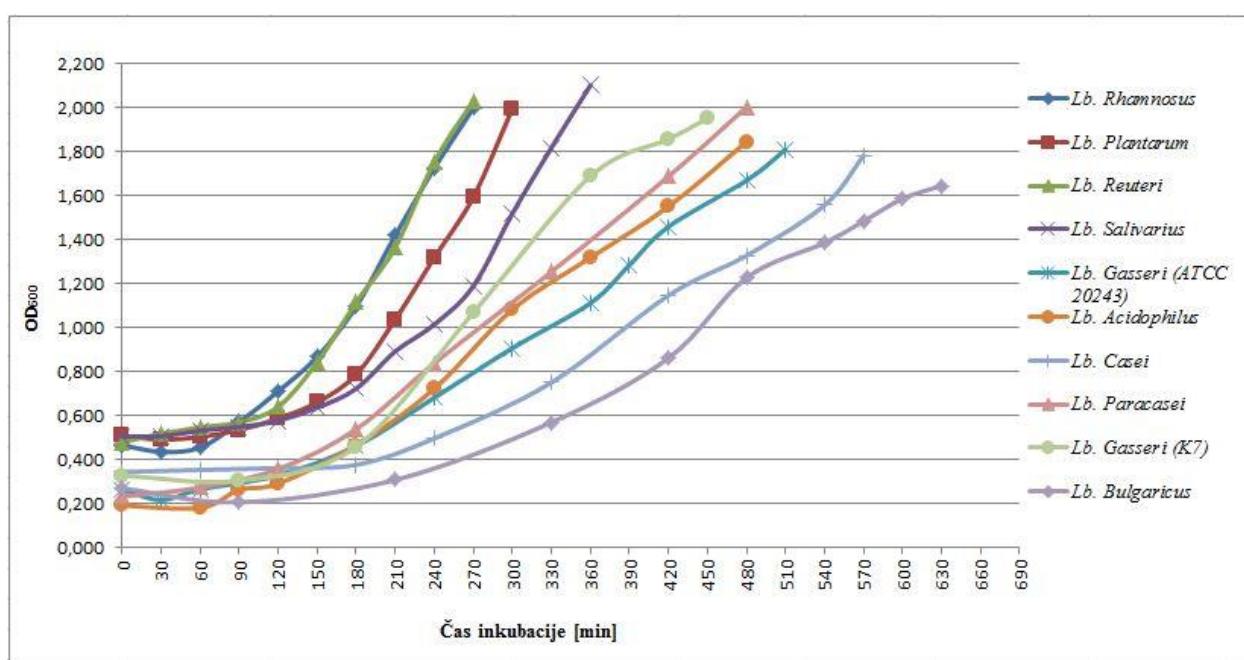
n= število paralelk

V osmih urah smo se željeni optični gostoti približali pri nacepitvi 500 µl prekonočne kulture. Tako smo pri vseh nadaljnih poskusih uporabljali 500 µl inokuluma oz. končno redčitev prekonočne kulture v svežem tekočem gojišču MRS v razmerju 1:20.

## 4.3 GOJENJE DELOVNIH KULTUR

### 4.3.1 Rastne krivulje sevov *Lactobacillus*

Delovnim kulturam izbranih sevov smo merili optično gostoto vsakih 30 min brez odpiranja epruvete (merjenje je potekalo v epruvetah s stranskimi cevkami). Vsak sev smo gojili v dveh paralelkah in izračunali povprečno vrednost. Prikaz povprečnih vrednosti izmerjenih meritev optične gostote za posamezen sev prikazuje Slika 6.



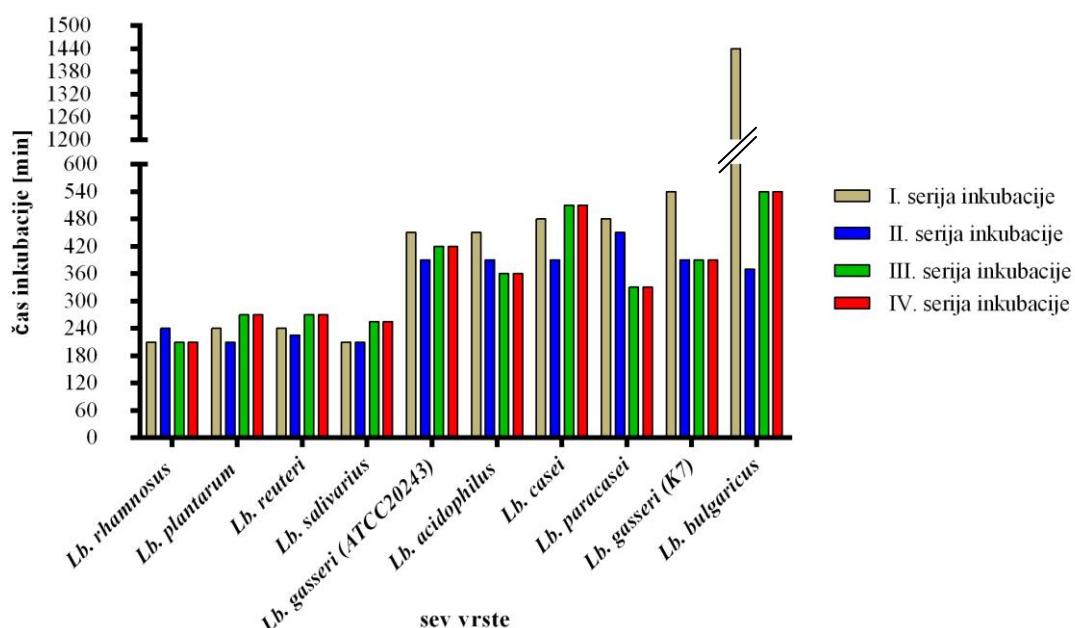
Slika 6: Prikaz povprečnih vrednosti izmerjene optične gostote bakterijskih kultur v odvisnosti od časa inkubacije za posamezne seve *Lactobacillus*.

Iz Slike 6 je razvidno, da nekateri sevi rastejo bistveno počasneje od drugih. Hitreje so rasle mikrobne populacije sevov vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* in *Lb. salivarius*, ki so optično gostoto OD~2,0 doseglo v vsaj 6 urah. Vsi ostali sevi so do optične gostote OD~2,0 rasli dlje časa, in sicer od 7,5 do 10,5 ur. Sevi, ki so v delovni kulturi rasli hitreje, so kazali hitrejšo rast tudi v prekonočni kulturi in so ustrezno gostoto dosegli že po enodnevnom inkubiranju. Izjema je sev *Lb. gasseri* ATCC 20243, ki je v prekonočni kulturi rasel podobno hitro kot omenjeni širje sevi, v produkcijski fazni pa je rasel počasneje.

#### 4.3.2 Čas gojenja sevov rodu *Lactobacillus* v delovni kulturi in izmerjena optična gostota po inkubaciji.

Vsek sev smo v delovni kulturi gojili ločeno in za vsako zdravilno učinkovino posebej. Tako smo vse seve gojili v štirih ločenih serijah. Ena serija gojenja sevov do optiče gostote OD ~2,0 tako predstavlja gojenje sevov pred dodatkom ene zdravilne učinkovine. Čas inkubacije delovne kulture, do optične gostote OD~2,0, se je med sevi in med posameznimi serijami močno razlikoval. Prav tako smo opazili, da se pri nekaterih sevih pojavijo razlike v času inkubacije do optične gostote OD~2,0 v odvisnosti od starosti plošče, s katere smo pobrali kolonije za pripravo kulture.

Slika 7 prikazuje čas inkubacije posameznega seva rodu *Lactobacillus* do optične gostote OD~2,0 v posamezni seriji inkubacije sevov.



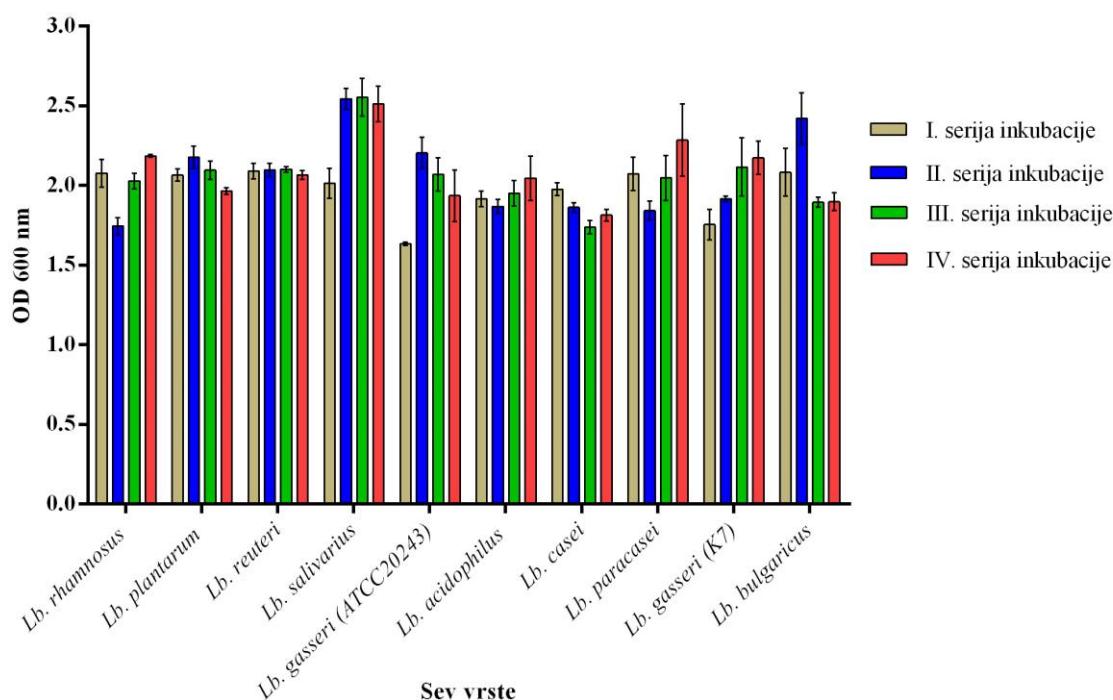
Slika 7: Čas inkubacije posameznega seva laktobacilov do optične gostote OD~2,0 v posameznih serijah inkubacije delovne kulture.

Iz Slike 7 je razvidno koliko časa je potreboval posamezen sev, da je zrasel do optične gostote OD~2,0 pred dodatkom posamezne zdravilne učinkovine. Različna barva stolpca označuje posamezno serijo gojenja delovne kulture. Časi inkubacije posameznega seva so enaki pri III. in IV. seriji inkubacije (zelen in rdeč stolpec), ki smo ju izvajali sočasno, ločeno pa smo pripravljali kulturi za dodatek zdravilnih učinkovin verapamil in raloksifen. Sevi vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* in *Lb. salivarius* so v primerjavi s ostalimi sevi najhitreje dosegli optično gostoto OD~2,0. Vsi štirje sevi so imeli primerljiv čas inkubacije, časi inkubacije pa so najmanj odstopali glede na serijo inkubacije. Pri sevih, ki so rasli hitreje, smo zabeležili hitrejšo rast tudi v prekonočni kulturi.

Majhno odstopanje med posameznimi serijami inkubacije smo opazili tudi pri sevu vrste *Lb. gasseri*, pri katerem je bil čas inkubacije nekoliko daljši od prej omenjenih štirih sevov. Čas inkubacije do optične gostote OD~2,0 med različnimi serijami inkubacije je najbolj odstopal pri sevu vrste *Lb. bulgaricus*. Večje odstopanje smo opazili tudi pri sevu vrste *Lb. paracasei* (I. in II. serija) in sevu *Lb. gasseri* K7 (I. serija).

Pri delu smo se trudili, da smo učinkovine dodali, ko je kultura dosegla optično gostoto OD~2,0. Zaradi načina merjenja optične gostote je bilo to v praksi težko izvedljivo, zato je v posameznih primerih prišlo tudi do manjših odstopanj.

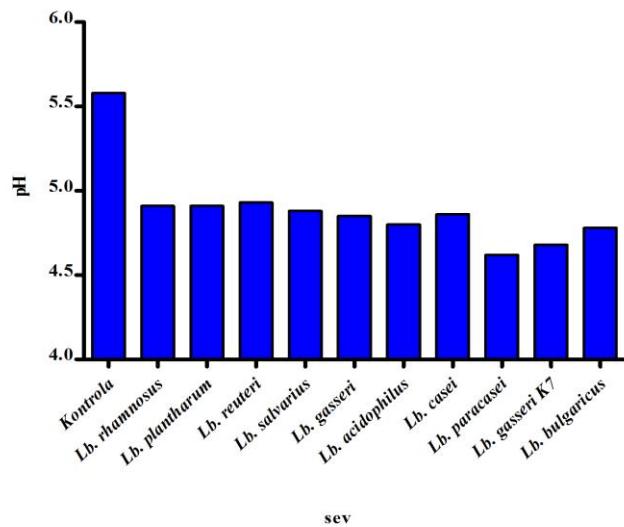
Na Sliki 8 so prikazana povprečja izmerjenih optičnih gostot kultur sevov *Lactobacillus* ob dodatku zdravilne učinkovine v posamezni seriji inkubacije.



Slika 8: Povprečna vrednost izmerjene optične gostote kultur sevov laktobacilov z odstopanjem v posamezni seriji gojenja

#### 4.4 pH VREDNOSTI DELOVNIH KULTUR SEVOV *LACTOBACILLUS* OB ZAKLJUČKU INKUBACIJE (OD~2,0)

Meritev pH vrednosti kultur posameznih sevov smo izvedli pred dodatkom posamezne zdravilne učinkovine (ob optični gostoti kulture OD =2,0). pH vrednosti kultur sevov so prikazane na Sliki 9.



Slika 9: pH vrednosti kultur sevov *Lactobacillus* po inkubaciji pri 37 °C in doseženi optični gostoti OD~2,0.

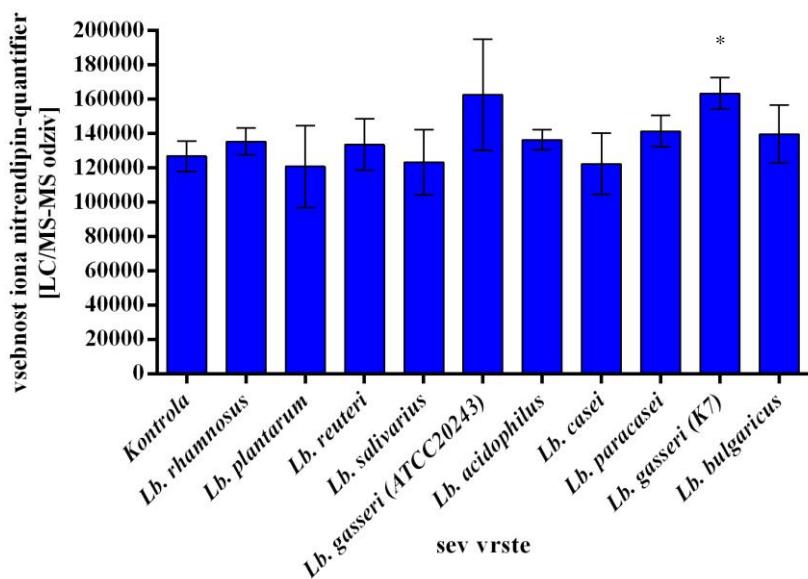
Iz Slike 9 je razvidno, da so imeli vsi vzorci, vključno s kontrolo (sterilno gojišče) pH vrednost pod pH 7. Kulture so po inkubaciji dosegle pH vrednosti, ki so bile nižje od pH vrednosti tekočega MRS gojišča. pH vrednosti kultur so bile med 4,62 in 4,93. Najnižjo pH vrednost, 4,62, smo izmerili sevu vrste *Lb. paracasei*, podoben pH (4,68) pa je dosegel tudi sev *Lb. gasseri K7*. Najvišjo pH vrednost so dosegli sevi vrst *Lb. reuteri* (4,93), *Lb. plantarum* (4,91) in *Lb. rhamnosus* (4,92).

## 4.5 DOLOČITEV KONCENTRACIJ UČINKOVIN IN NJIHOVIH METABOLITOV PO INKUBACIJI S KULTURAMI BAKTERIJ IZ RODU *LACTOBACILLUS*

### 4.5.1 Določanje koncentracije nitrendipina in njegovih metabolitov

Pri vzorcih z nitrendipinom smo analizirali vsebnost ionov nitrendipin quantifier in nitrendipin qualifier ter vsebnost spojine dehidronitrendipin. Quantifier ion predstavlja ionizirano obliko z najvišjim odzivom oz. prvi pridobljeni najvišji signal. Qualifier ion predstavlja obliko z drugim najvišjim odzivom oz. drugim pridobljenim najvišjim signalom in služi za potrditev identitete. Dehidronitrendipin pa je eden izmed razpadnih produktov nitrendipina.

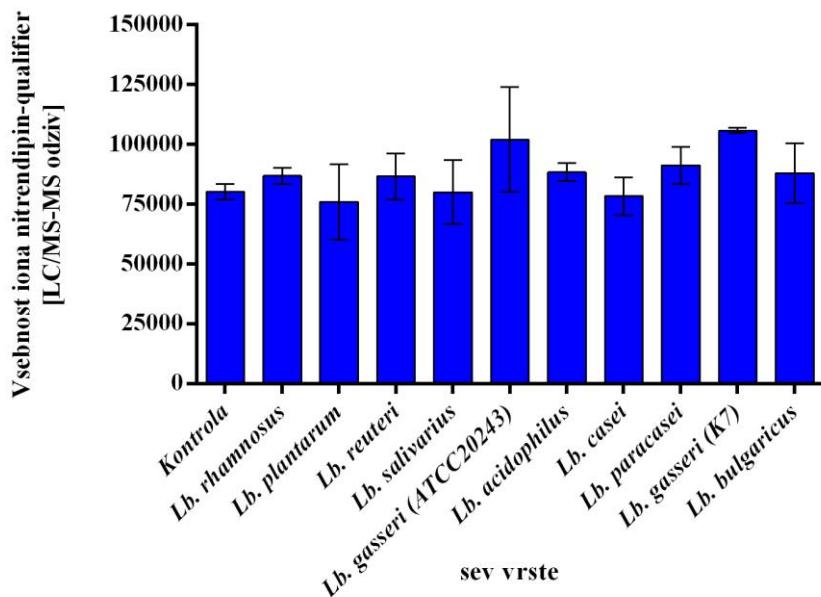
Vsebnost iona nitrendipin quantifier po inkubaciji s sevi *Lactobacillus* in v kontroli je prikazana na Sliki 10.



Slika 10: Vsebnost iona nitrendipin quantifier v vzorcih supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin.

Pri stolpcih označenih z zvezdico (\*) so vsebnosti spojine statistično značilno drugače od kontrole, kar lahko potrdimo s 95 % intervalom zaupanja. Prikazane so povprečne vrednosti s standardno deviacijo.

Vsebnost iona nitrendipin qualifier v vzorcih sevov *Lactobacillus* je prikazana na Sliki 11.



Slika 11: Vsebnost iona nitrendipin qualifier v vzorcih supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin

Po dobljenih meritvah vsebnosti ionov nitrendipin quantifier in nitendipin qualifier smo izračunali razmerje med obema ionoma (Preglednica 10).

**Preglednica 10: Povprečna vsebnost ionov nitrendipin quantifier in nitendipin qualifier ter izračanano razmerje med njima v vzorcih supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin.**

Vzorec	Povprečna vsebnost iona nitrendipin quantifier	Povprečna vsebnost iona nitrendipin qualifier	Razmerje quanti./qual.
Kontrola	126930	80271	1,58
<i>Lb. rhamnosus</i>	135483	86951	1,56
<i>Lb. plantarum</i>	120929	76035	1,59
<i>Lb. reuteri</i>	133586	86634	1,54
<i>Lb. salivarius</i>	123335	80118	1,54
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	162806	102091	1,59
<i>Lb. acidophilus</i>	136344	88481	1,54
<i>Lb. casei</i>	122434	78387	1,56
<i>Lb. paracasei</i>	141451	91301	1,55
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	163490	105864	1,54
<i>Lb. bulgaricus</i>	139810	88046	1,59

Iz Slike 10 in Slike 11 opazimo, da sta grafa podobna, le vsebnosti iona nitrendipin qualifier so nižje. Iz Preglednice 10 opazimo, da je razmerje med vsebnostima ionov nitrendipin quantifier in nitrendipin qualifier bolj ali manj konstantno in v nobenem primeru ne odstopa za več kot 20 %. Iz tega lahko sklepamo, da smo z uporabljenou metodo res identificirali pravilno spojino.

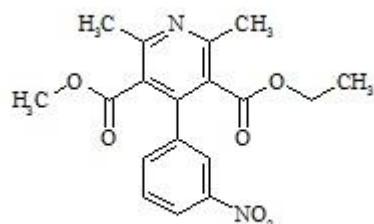
Pri večini sevov opazimo navidezno povišanje koncentracije nitrendipina, ki pa je le v enem primeru statistično signifikantno, to je pri sevu *Lb. gasseri* K7. Najnižjo vsebnost spojine nitrendipin smo izmerili pri sevu vrste *Lb. casei*. Pri večini vzorcev so se pojavila velika odstopanja med izmerjenimi posameznimi paralelkami.

Izmerjene vsebnosti nitrendipina v posameznem vzorcu smo primerjali s kontrolo. Predpostavili smo, da povprečna vsebnost nitrendipina v kontrolnem vzorcu predstavlja 100 % vsebnosti. Vsebnosti nitrendipina v ostalih vzorcih glede na kontrolo in izražene v odstotkih so prikazane v Preglednici 11.

**Preglednica 11: Odstotek povprečne vsebnosti nitrendipina v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov *Lactobacillus* glede na vsebnost v kontroli**

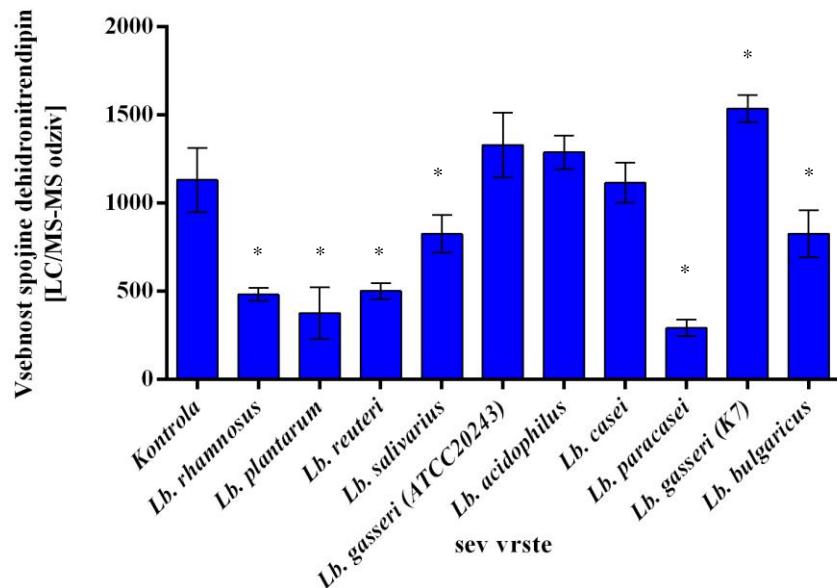
Vzorec	% vsebnosti
Kontrola	100,00
<i>Lb. rhamnosus</i>	106,74
<i>Lb. plantarum</i>	95,27
<i>Lb. reuteri</i>	105,24
<i>Lb. salivarius</i>	97,17
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	128,26
<i>Lb. acidophilus</i>	107,42
<i>Lb. casei</i>	96,46
<i>Lb. paracasei</i>	111,44
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	128,80
<i>Lb. bulgaricus</i>	110,15

V vzorcih smo merili tudi prisotnost spojine dehidronitrendipin, ki je razpadni produkt spojine nitrendipin. Strukturna formula spojine dehidronitrendipin je prikazana na Sliki 11.



**Slika 12: Strukturna formula spojine dehidronitrendipin (Dehydro..., 2014)**

Vsebnosti dehidronitrendipina v vzorcih supernatantov kultur sevov in kontroli je prikazana na Sliki 13.

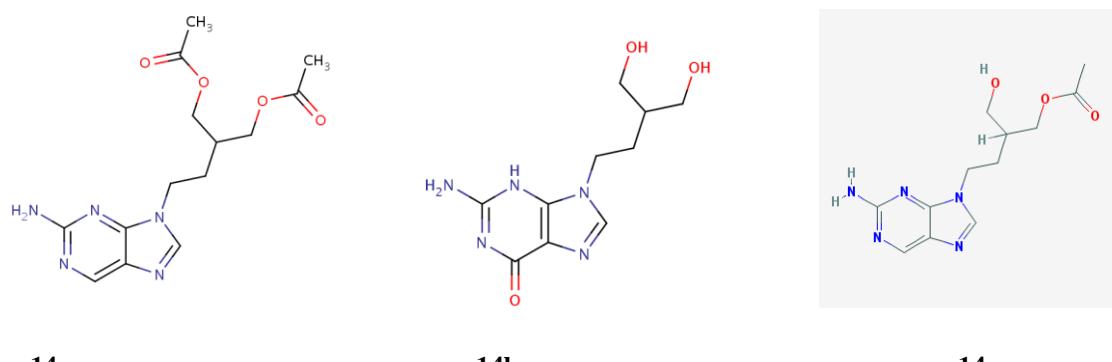


Slika 13: Vsebnost spojine dehidronitrendipin v vzorcih supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino nitrendipin

Vsebnost dehidronitrendipina je pri vseh vzorcih precej nižja od vsebnosti osnovne spojine nitrendipin. Izmerjeni odzivi na spojino dehidronitrendipin predstavljajo le približno 1 % odziva na osnovno učinkovino nitrendipin. Seve lahko v grobem uvrstimo v dve skupini. Sevi, ki zvišajo vsebnost dehidronitrendipina v supernatantih kultur, v primerjavi s kontrolo (vrste *Lb. gasseri* (oba seva), *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*) in ostali sevi, ki pa vsebnost dehidronitrendipina znižajo.

#### 4.5.2 Določanje koncentracije famciklovirja in njegovih metabolitov

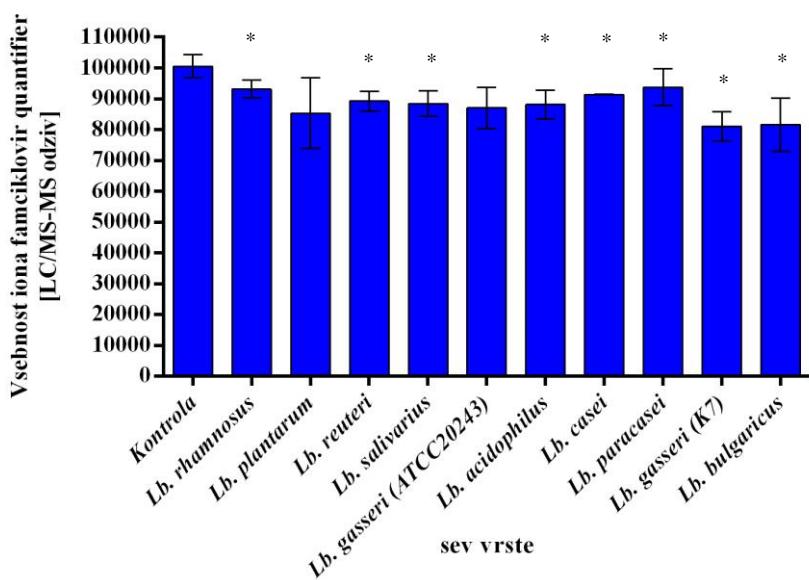
Po koinkubaciji sevov *Lactobacillus* z zdravilno učinkovino famciklovir, smo v vzorcih poleg najpogostejših ionov famciklovir quantifier in famciklovir quantifier merili še vsebnost dveh spojin, in sicer spojini penciklovir in deacetil famciklovir. Penciklovir je spojina, za katero famciklovir predstavlja predzdravilo z izboljšano biološko uporabnostjo. Praktično gre za aktivno obliko zdravilne učinkovine, do katere pride tekom presnove v organizmu. Deacetil famciklovir pa je derivat spojine penciklovir. Strukture preiskovanih spojin v vzorcih po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir so prikazane na Sliki 14.



Slika 14: Strukturne formule spojin identificirane v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir (DrugBank, 2013, PubChem, 2013).

14a) famciklovir, 14b) penciklovir, in 14c) deacetil famciklovir.

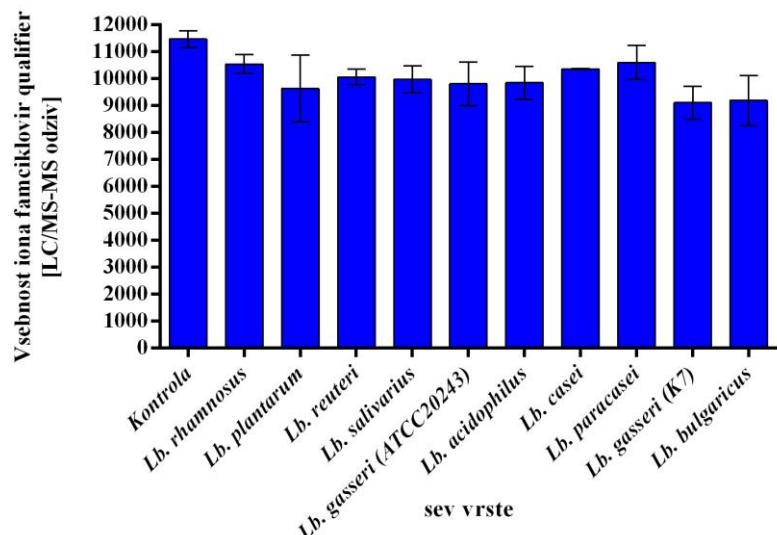
Vsebnost iona famciklovir quantifier v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontrolnem vzorcu, kjer je bila zdravilna učinkovina dodana v sterilno MRS gojišče, je prikazana na Sliki 15.



Slika 15: Vsebnost iona famciklovir quantifier v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir.

Pri stolpcih označenih z zvezdico (\*) je zmanjšanje vsebnosti spojine statistično značilno drugačno od kontrole, kar lahko potrdimo s 95 % intervalom zaupanja. Prikazane so povprečne vrednosti s standardno deviacijo.

Vsebnost iona famciklovir qualifier v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* je prikazana na Sliki 16.



Slika 16: Vsebnost iona famciklovir qualifier v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kotroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir.

Izračunali smo tudi razmerje med ionoma famciklovir quantifier in famciklovir qualifier. Povprečna vsebnost posameznega iona in razmerje med njima je prikazano v Preglednici 12.

**Preglednica 12: Povprečna vsebnost ionov famciklovir quantifier in famciklovir qualifier ter izračanano razmerje med njima v vzorcih supernatanov kultur sevov in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir.**

Vzorec	Povprečna vsebnost iona famciklovir quantifier	Povprečna vsebnost iona famciklovir qualifier	Razmerje quanti./qual.
Kontrola	102724	11472	8,9541
<i>Lb. rhamnosus</i>	93046	10548	8,8212
<i>Lb. plantarum</i>	85304	9632	8,8566
<i>Lb. reuteri</i>	89237	10067	8,8647
<i>Lb. salivarius</i>	88431	9977	8,8633
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	87039	9813	8,8694
<i>Lb. acidophilus</i>	88098	9858	8,9370
<i>Lb. casei</i>	91368	10363	8,8171
<i>Lb. paracasei</i>	93737	10605	8,8388
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	81086	9111	8,9001
<i>Lb. bulgaricus</i>	81593	9195	8,8733

Razmerje med ionoma famciklovir quantifier in famciklovir qualifier je pri vseh vzorcih praktično konstantno in v nobenem primeru odstopanje ni večje od 20 %. Tako smo tudi pri zdravilni učinkovini famciklovir potrdili, da je identificirana spojina pravilna.

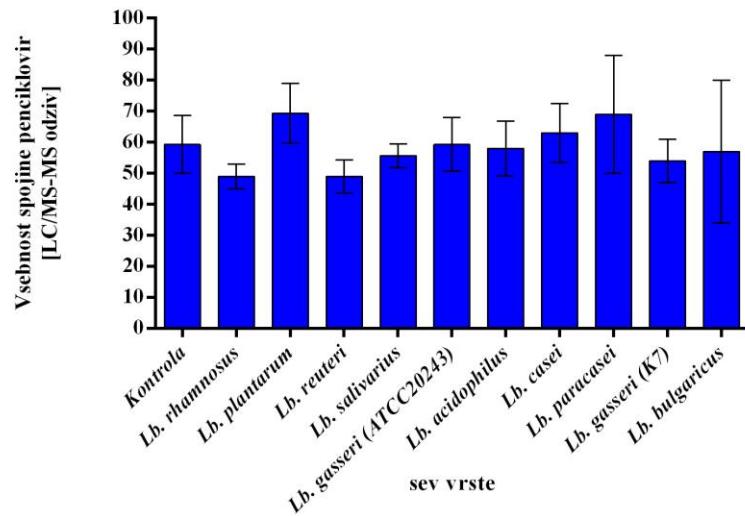
Vsebnost spojine famciklovir je bila najvišja pri kontrolnem vzorcu. Pri supernatantih kultur sevov iz rodu *Lactobacillus* je vsebnost nekoliko nižja. Statistično značilno znižanje smo izmerili pri sevih vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. gasseri* (K7), *Lb. bulgaricus*. Ponovljivost med posameznimi paralelkami istega seva je dobra, izstopata le seva vrst *Lb. bulgaricus* in *Lb. plantarum*, kjer je odstopanje med posameznimi paralelkami nekoliko večje.

Tudi pri spojni famciklovir smo izračunali, koliko odstotkov spojine se je nahajalo v posameznem vzorcu glede na kontrolo. Predpostavili smo, da je vsebnost v kontrolnem vzorcu enaka 100 %. Odstotek vsebnosti famciklovirja v posameznem vzorcu glede na kontrolni vzorec je prikazan v Preglednici 13.

Preglednica 13: Odstotek povprečne vsebnosti famciklovirja v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov *Lactobacillus* glede na vsebnost v kontroli

Vzorec	% vsebnosti
Kontrola	100,00
<i>Lb. rhamnosus</i>	92,54
<i>Lb. plantarum</i>	84,84
<i>Lb. reuteri</i>	88,75
<i>Lb. salivarius</i>	87,95
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	86,57
<i>Lb. acidophilus</i>	87,62
<i>Lb. casei</i>	90,87
<i>Lb. paracasei</i>	93,23
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	80,65
<i>Lb. bulgaricus</i>	81,15

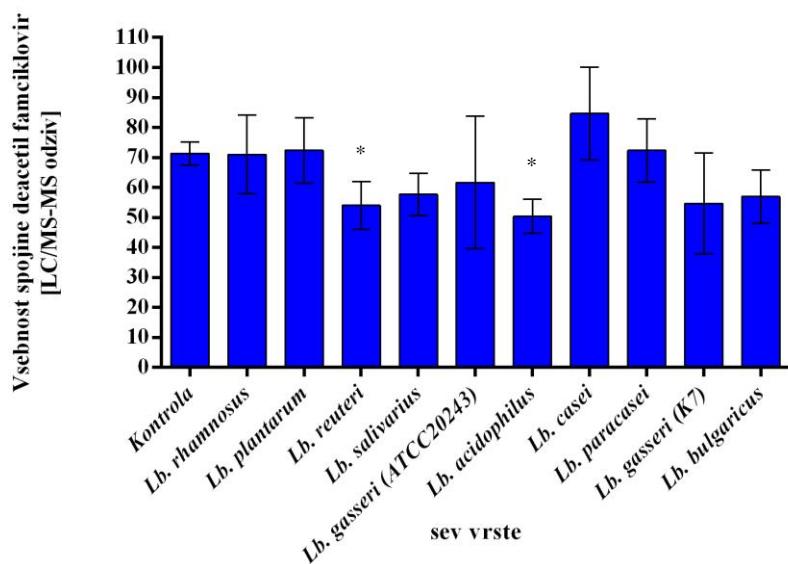
Vzporedno z vsebnostjo ionov famciklovir quantifier in famciklovir qualifier, smo pri sevih *Lactobacillus* po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir merili tudi prisotnost spojine penciklovir. Vsebnost spojine penciklovir v vzorcih supernatanov kultur sevov in v kontrolnem vzorcu je prikazana na Sliki 17.



Slika 17: Vsebnost spojine penciklovir v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kotroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino famciklovir.

Spojina penciklovir je bila v vzorcih supernatnov kultur koinkubiranih z zdravilno učinkovino famciklovir prisotna v zelo nizkih količinah. Odziv vzorcev na spojino penciklovir je predstavljal <1 % odziva na preiskovano spojino famciklovir. Pojavilo se je tudi veliko odstopanje v izmerjeni vsebnosti med paralelkami istega seva. Tako je bilo razlike med vsebnostmi spojine penciklovir v posameznih vzorcih zelo težko določiti. V povprečju je bila izmerjena vsebnost penciklovirja primerljiva med vsemi vzorci.

Pri vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* koinkubiranih z zdravilno učinkovino famciklovir smo izmerili tudi vsebnost spojine deacetil famciklovir. Vsebnosti omenjene spojine v posameznih vzorcih so prikazane na Sliki 18.



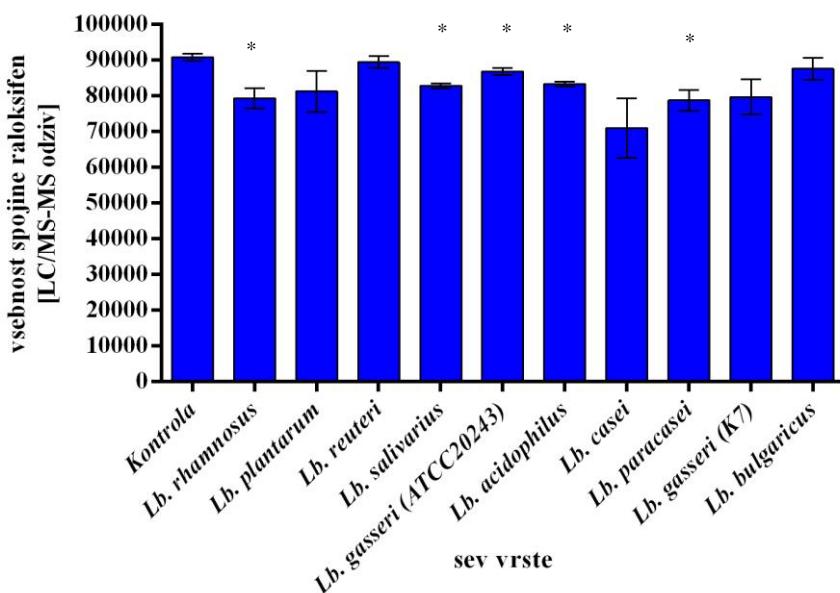
Slika 18: Vsebnost spojine deacetil famciklovir v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontrolnem vzorcu po koinkubaciji sevov z zdravilno učinkovino famciklovir.

Pri stolpcih označenih z zvezdico (\*) je zmanjšanje vsebnosti spojine statistično značilno drugačno od kontrole, kar lahko potrdimo s 95 % intervalom zaupanja. Prikazane so tudi povprečne vrednosti s standardno deviacijo.

Tudi spojina deacetil famciklovir je bila v vseh vzorcih prisotna v zelo majhnih količinah, saj so tudi tukaj izmerjene vsebnosti precej nižje od vsebnosti ionov famciklovir quantifier in famciklovir qualifier. Tudi v tem primeru je odziv <1 % odziva na osnovno spojino. Zopet se je pojavilo veliko odstopanje v izmerjeni vsebnosti med paralelkami istega seva. To pomeni, da je bilo tudi razlike med vsebnostmi spojine deacetil famciklovir v posameznem vzorcu težko določiti. V povprečju pa je vsebnost spojine deacetil famciklovir pri vseh vzorcih primerljiva, statistično manjša je bila pri sevih *Lb. reuteri* in *Lb. acidophilus*.

#### 4.5.3 Določanje koncentracije raloksifena

Ker smo pri vzorcih koinkubiranih z zdravilnima učinkovinama nitrendipin in famciklovir z meritvami vsebnosti ionov quantifier in qualifier dokazali pravilnost metod za identificiranje želene spojine, smo pri vzorcih supernatanov kultur sevov, koinkubiranih z zdravilno učinkovino raloksifen, merili samo vsebnost spojine raloksifen. Vsebnost raloksifena v posamezem vzorcu je prikazana na Sliki 19.



Slika 19: Vsebnost spojine raloksifen v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino raloksifen.

Pri stolpcih označenih z zvezdico (\*) je zmanjšanje vsebnosti spojine statistično značilno različno od kontrole, kar lahko potrdimo s 95 % intervalom zaupanja. Prikazana so povprečne vsebnosti s standardno deviacijo.

Najvišjo vsebnost spojine raloksifen smo izmerili pri kontrolnem vzorcu, kjer je bila zdravilna učinkovina dodana v sterilno tekoče MRS gojišče. Do statistično značilnega znižanja koncentracije spojine raloksifen je prišlo pri sevih vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *Lb. gasseri* (ATCC 20243), *Lb. acidophilus* in *Lb. paracasei*. Največje znižanje koncentracije smo opazili pri sevu *Lb. casei*, vendar zaradi večjega odstopanja med meritvami posameznih paralelk, zmanjšanje ni bilo značilno.

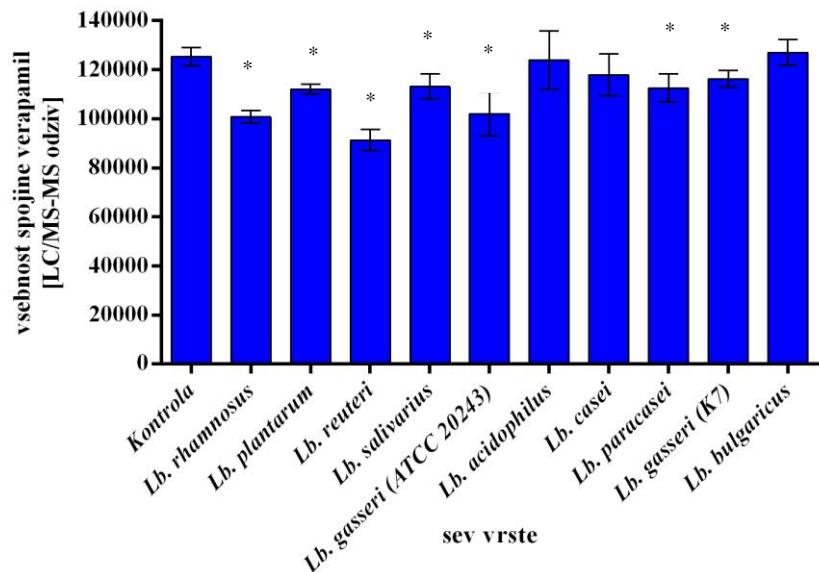
Izračunali smo tudi, kolikšen delež raloksifena je ostal v posameznem vzorcu. Predpostavili smo, da je vsebnost raloksifena v kontroli enaka 100,00 %. Delež raloksifena v posameznem vzorcu glede na kontrolo je prikazan v Preglednici 14.

Preglednica 14: Odstotek povprečne vsebnosti raloksifena v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov *Lactobacillus* glede na vsebnost v kontroli

Vzorec	% vsebnosti
Kontrola	100,00
<i>Lb. rhamnosus</i>	87,32
<i>Lb. plantarum</i>	89,40
<i>Lb. reuteri</i>	98,47
<i>Lb. salivarius</i>	91,15
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	95,55
<i>Lb. acidophilus</i>	91,70
<i>Lb. casei</i>	78,13
<i>Lb. paracasei</i>	86,67
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	87,73
<i>Lb. bulgaricus</i>	96,44

#### 4.5.4 Določanje koncentracije verapamila

Podobno kot pri vzorcih koinkubiranih z raloksifenom, smo tudi pri vzorcih koinkubiranih z zdravilno učinkovino verapamil preverjali le vsebnost spojine verapamil, ne pa tudi vsebnosti ionov quantifier in qualifier. Izmerjene povprečne vsebnosti verapamila v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli so prikazane na Sliki 20.



Slika 20: Vsebnost spojine verapamila v vzorcih supernatanov kultur sevov *Lactobacillus* in kontroli po koinkubaciji z zdravilno učinkovino verapamil.

Pri stolpcih označenih z zvezdico (\*) je zmanjšanje vsebnosti spojine statistično značilno drugačno od kontrole, kar lahko potrdimo s 95 % intervalom zaupanja. Prikazane so povprečne vsebnosti s standardno deviacijo.

Pri večini vzorcev smo izmerili nižjo vsebnost spojine verapamil kot pri kontrolnem vzorcu. Do statistično značilnega zmanjšanja koncentracije verapamila je prišlo pri sevih *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*, *Lb. gasseri* (oba seva) in *Lb. paracasei*. Do znižanja koncentracije je prišlo tudi pri sevu vrste *Lb. casei*, vendar to ni bilo statistično značilno. Najnižjo povprečno vsebnost spojine verapamil smo izmerili sevu vrste *Lb. reuteri*, kjer je prišlo do skoraj 30 % znižanje koncentracije spojine verapamil.

Izračunali smo tudi, kolikšna je bila povprečna vsebnost verapamila v posameznem vzorcu glede na vsebnost v kontroli. Predpostavili smo, da je povprečna vsebnost verapamila v kontroli enaka 100,00 %. V odstotkih izražena povprečna vsebnost verapamila v posameznem vzorcu glede na kontrolo je prikazana v Preglednici 15.

**Preglednica 15: Odstotek povprečne vsebnosti verapamila v posameznem vzorcu supernatanta kultur sevov *Lactobacillus* glede na vsebnost v kontroli**

Vzorec	% vsebnosti
Kontrola	100
<i>Lb. rhamnosus</i>	80,41
<i>Lb. plantarum</i>	88,91
<i>Lb. reuteri</i>	72,82
<i>Lb. salivarius</i>	90,24
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	81,43
<i>Lb. acidophilus</i>	98,85
<i>Lb. casei</i>	94,06
<i>Lb. paracasei</i>	89,79
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	92,73
<i>Lb. bulgaricus</i>	101,35

#### 4.5.5 Rezultati testa ANOVA

S pomočjo testa ANOVA v programu GarphPad Prism 6 smo ugotavljali, ali so znižanja vsebnosti določene spojine v posameznem vzorcu statistično signifikantna ali ne. Zaradi lažje primerljivosti so rezultati vseh vzorcev pri določeni spojni združeni v eno preglednico. Prav tako smo z ANOVA testom ovrednotili obseg signifikance, ki je označen s zvezdicami (\*). Kadar je  $p < 0,001$  je signifikanca ekstremna (\*\*\*) , kadar je  $p$  vrednost med 0,001 in 0,01 je signifikanca velika (\*\*), kadar pa je  $p$  vrednost med 0,01 in 0,05 pa je razlika signifikantna (\*). Rezultate, pri katerih je  $p > 0,05$ , (razlika ni signifikantna) smo označili z X. Rezultati ANOVA testa so prikazani v Preglednici 16.

**Preglednica 16:** Rezultati po ANOVA testu, ki prikazujejo stopnjo statično značilnega zmanjšanja koncentracije zdravilnih učinkov pri posameznemu vzorcu (X- nesignifikantna razlika, \*- signifikantna razlika, \*\*- zelo signifikantna razlika, \*\*\*- ekstremno signifikantna razlika).

Vzorec	Učinkovina			
	Nitrendipin	Famciklovir	Raloksifen	Verapamil
<i>Lb. rhamnosus</i>	X	X	X	**
<i>Lb. plantarum</i>	X	X	X	X
<i>Lb. reuteri</i>	X	X	X	***
<i>Lb. salivarius</i>	X	X	X	X
<i>Lb. gasseri</i> (ATCC 20243)	X	X	X	**
<i>Lb. acidophilus</i>	X	X	X	X
<i>Lb. casei</i>	X	X	***	X
<i>Lb. paracasei</i>	X	***	*	X
<i>Lb. gasseri</i> (K7)	X	*	X	X
<i>Lb. bulgaricus</i>	X	*	X	X

Rezultati v Preglednici 16 nam povedo ali je prišlo do signifikantne razlike v povprečni vsebnosti posamezne zdravilne učinkovine v vzorcih glede na kontrolo in kako velika je ta razlika. Do rezultatov smo prišli z uporabo statistične metode ANOVA, ki so ji sledile primerjave parov z uporabo testa po Bonferroniju.

S pomočjo statističnega testa ANOVA smo pridobili tudi podatke o variabilnosti med vrednostmi vseh vsebnosti zdravilnih učinkovin v supernatantih kultur proučevanih sevov po koinkubaciji v gojišči MRS.

Rezultati ANOVA testa za vse vzorce supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* po koinkubaciji z zdravilnimi učinkovinami nitrendipin, famciklovir, raloksifen in verapamil so prikazani v Preglednici 17.

**Preglednica 17:** Rezultati ANOVA testa, ki prikazujejo F-vrednost, stopnjo signifikance (\*\* = ekstremno signifikantna razlika ( $p < 0,001$ ), \*\* = velika signifikantna razlika ( $0,001 < p < 0,01$ ), \* = signifikantna razlika ( $0,01 < p < 0,05$ ), X = nesignifikantna razlika ( $p > 0,05$ )), p-vrednost in  $R^2$  – vrednost za vse vzorce supernatantov kultur sevov *Lactobacillus* po koinkubaciji s posamezno zdravilno učinkovino.

Učinkovina	F-vrednost	Stopnja signifikance	p-vrednost	$R^2$
nitrendipin	2,302	*	0,0496	0,5113
famciklovir	22,85	***	< 0,0001	0,9122
raloksifen	6,8465	***	< 0,0001	0,756812
verapamil	9,757	***	< 0,0001	0,8160

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Zaradi številnih koristnih učinkov se v modernem času težnja po probiotičnih izdelkih povečuje. Tako so probiotične bakterije vključene v številne prehranske izdelke in prehranska dopolnila. Nekatere izdelke celo predpisujejo zdravniki in drugi strokovnjaki iz področja prehrane. Posledici sodobnega načina življenja v razvitem svetu in daljšanja življenske dobe sta pogostejše obolevanje in posledično uživanje večjih količin zdravilnih učinkovin. To pomeni, da se povečuje možnost interakcij med zdravilnimi učinkovinami in probiotičnimi kulturami, še posebno takrat, kadar sočasno uživamo zdravila in probiotike. Med probiotičnimi bakterijami se najpogosteje uporablajo sevi vrst iz rodu *Lactobacillus*. Tako nas je v okviru magistrskega dela zanimalo ali izbrani sevi rodu *Lactobacillus* morebiti znižujejo koncentracijo štirih zdravilnih učinkovin, ki so v pogosti uporabi.

Znano je, da so črevesne bakterije s svojo metabolno aktivnostjo sposobne razgradnje številnih zdravilnih učinkovin (Wilson in Nicholson, 2009 in Scheline, 1973). Za razliko od človeškega metabolizma zdravilnih učinkovin, ki temelji predvsem na oksidacijskih reakcijah, črevesne bakterije vršijo predvsem reakcije redukcije (Sousa in sod., 2008). Tudi sevi vrst iz rodu *Lactobacillus* lahko vplivajo na ksenobiotike. Primer je detoksifikacija kancerogenov, kot so na primer Aflatoksin B<sub>1</sub> (Fuchs in sod., 2007), TRP-1-P (Knassmüller in sod., 2001) TRP-2-P (Knassmüller in sod., 2001, Orehage in sod., 1994 in Piotrowska in Zakowska, 2005) in oharotoksin A (Fuchs in sod., 2007).

Pri vplivanju bakterij na zdravilne učinkovine igra pomembno vlogo tudi lipofilnost molekule ( $\log P$ ). To je vrednost, ki nam pove kako lipofilna je molekula. Višja kot je vrednost  $\log P$ , bolj je molekula lipofilna in lažje prehaja celično membrano (Pradhan in Majumdar, 1986).

V našem delu smo uporabili po en sev osmih različnih vrst rodu *Lactobacillus* in dva seva vrste *Lb. gasseri*. Felis in Dellaglio (2007) sta pri svoji taksonomski razporeditvi bakterije rodu *Lactobacillus* glede na vrsto razporedila še v podskupine. V te podskupine sta razporedila vrste, ki so si med seboj podobne v metabolizmu glukoze, v vsebnosti gvanin-citozin (GC) parov, sestavi celične stene, in prodkuciji izomera mlečne kisline tekom fermentacije. Glede na njuno taksonomsko razporeditev vrst rodu *Lactobacillus* v podskupine, lahko naše seve razvrstimo kar v 5 različnih podskupin:

- podskupina *Lb. acidophilus* (sevi: *Lb. acidophilus* ATCC 3456, *Lb. gasseri* ATCC 20243, *Lb. gasseri* K7, *Lb. bulgaricus* ATCC 11842; obligatno homofermentativni tip metabolizma glukoze, vsebnost GC 34-37 %, vsebnost GC *Lb. bulgaricus* ATCC 11842 49-51 % );

- podskupina *Lb. salivarius* (sev: *Lb. salivarius* LMG 9477; obligatno homofermentativni tip metabolizma glukoze, vsebnost GC 34-36 %);
- podskupina *Lb. reuteri* (sev: *Lb. reuteri* ATCC 55730; obligatno heterofermentativni tip metabolizma glukoze, vsebnost GC 40-42 %);
- podskupina *Lb. casei* (sevi: *Lb. casei* ATCC 393, *Lb. paracasei* DSM 5622, *Lb. rhamnosus* ATCC 53103; fakultativno heterofermentativni tip metabolizma glukoze, vsebnost GC 45-47%);
- podskupina *Lb. plantarum* (sev *Lb. plantarum* ATCC 8014, fakultativno heterofermentativni tip metabolizma glukoze, vsebnost GC 44-46 %).

Sevi izbranih vrst rodu *Lactobacillus* so se razlikovali v hitrosti rasti in fermentacijskih lastnosti. Glede na hitrost rasti v gojišču MRS pri temperaturi 37 °C lahko seve laktobacilov, katere smo uporabili v raziskovalnem delu magistrske naloge, v grobem razdelimo v 2 skupini. In sicer v prvo skupino spadajo sevi vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius* in *Lb. gasseri* (ATCC 20243). Omenjeni sevi so rasli bistveno hitreje že v prekonočni kulturi in so že po eni noči dosegli zadostno optično gostoto za nacepitev v produksijsko fazo, medtem ko so ostali sevi za to potrebovali dve noči. Sevi, ki so rasli hitreje so za doseganje optične gostote OD~2,0 potrebovali povprečno 240 minut inkubacije pri 37 °C. Ostali sevi, ki so rasli počasneje, pa so za doseganje optične gostote OD~2,0 potrebovali povprečno 430 minut.

Pojavile so se tudi razlike v stopnji fermentacije, ki smo jo določali z merjenjem vrednosti pH, ko je kultura dosegla OD~2,0. pH vrednost sterilnega gojišča MRS je bila v povprečju 5,60 kar pomeni, da gre za rahlo kislo gojišče. Bakterijske kulture so med inkubacijo znižale pH gojišča do vrednosti, ki so se gibale med 4,62 in 4,93. Če primerjamo pH vrednosti kultur ob koncu inkubacije in čas inkubacije pri 37 °C, ki so ga potrebovale kulture, da so dosegle optično gostoto OD~2,0 (Slika 7 in Slika 9), v večini primerov opazimo, da so hitreje rastoči sevi med gojenjem manj znižali pH vrednost gojišča kot počasneje rastoči sevi.

Po koinkubaciji sevov vrst *Lactobacillus* z zdravilnimi učinkovinami, smo z metodo LC-MS/MS v supernatantih brezceličnih kultur določali vsebnost zdravilnih učinkovin in metabolitov. Gre za metodo, kjer se molekule v vzorcu najprej ločijo s tekočinsko kromatografijo, nato pa se v dveh zaporednih komorah masnega spektromетra določi molekulska masa posameznih molekul in se jih tudi identificira (Tobin in sod., 2010). Prednost metode je, da lahko v kratkem času uspešno analiziramo veliko število vzorcev ter identificiramo in kvantificiramo spojine, ki se nahajajo v posameznem vzorcu. Glavna slabost metode pa je, da moramo izbrati ustrezno kromatografijo za ločevanje analitov od produktov biotransformacije, če želimo, da bo metoda specifična za prepoznavo želenega analita (Jemal, 2000). Slabost pa je tudi, da metoda določi le molekulske mase spojin, zato moramo poznati vse metabolite posamezne učinkovine po njihovih molekulskeh masah (Tobin in sod., 2010).

Glede na razlike med sevi smo pričakovali tudi razlike v metabolizmu ali absorbciji zdravilne učinkovine. V vzorcih supernatantov kultur smo izmerili odziv posamezne učinkovine in ga relativno primerjali z odzivom kontrole (zdravilna učinkovina v tekočem gojišču MRS). Predvidevali smo, da bodo sevi vrst *Lactobacillus* med kopinkubacijo znižali vsebnost zdravilnih učinkovin, zato smo pričakovali nižjo vsebnost učinkovine v vzorcih v primerjavi z kontrolo.

Da bi zagotovili ustreznost analize, smo morali najprej potrditi identiteto spojine, ki smo jo kvantificirali. V ta namen smo uspešno razvili analizno metodo, ki je omogočala detekcijo v kompleksnem gojišču brez ekstrakcije. Pri vzorcih supernatantov kultur, koinkubiranih z zdravilnima učinkovinama nitrendipin in famciklovir smo najprej preučevali vsebnosti ionov quantifier in qualifier. Izračunali smo razmerje med njima, ki je bilo pri vseh vzorcih konstantno in ni odstopalo za več kot 20 %. S tem smo lahko potrdili pravilnost metode za identifikacijo omenjenih zdravilnih učinkovin (Mohsin in sod., 2007).

Vzporedno z vsebnostjo osnovnih spojin; nitrendipin, famciklovir, raloksifen in verapamil, smo s metodo LC-MS/MS v vzorcih preverjali prisotnost nekaterih metabolitov. Zaradi nepoznavanja vseh potencialnih metabolitov pri mikrobiini razgradnji testiranih zdravilnih učinkovin, le teh nismo določali v vzorcih, pač pa smo načrtno določali le vsebnosti poznanih metabolitov razgradnje učinkovin. Tako smo pri vzorcih kultur koinkubiranih z zdravilno učinkovino nitrendipin preverjali vsebnost metabolita dehidronitrendipina, pri vzorcih koinkubiranih s famciklovirjem pa vsebnost spojin penciklovir in deacetil famciklovir. Pri vzorcih koinkubiranih z raloksifenom in verapamilom nismo merili vsebnosti metabolitov, pač pa zgolj vsebnost osnovnih spojin.

Pri analizah vzorcev z dodanim nitrendipinom smo dobili nepričakovani rezultat, saj je bila pri večini vzorcev vsebnost nitrendipina višja kot pri kontroli. Do znižanja koncentracije je prišlo samo pri treh vzorcih, vendar pa znižanje koncentracije ni bilo pri nobenem vzorcu stastično značilno manjše od kontrole. Statistično značilno spremembo koncentracije glede na kontrolo smo dobili le pri sevu *Lb. gasseri K7*, kjer je bila koncentracija nitrendipina višja od kontrole. Pojavilo se je tudi veliko odstopanje med meritvami posameznih paralelk. Do takšnih rezultatov je najverjetneje prišlo zaradi eksperimentalne ali analitske napake. Navidezno povečanje koncentracije je lahko tudi posledica nepravilne priprave kontrolnega vzorca.

Po koinkubaciji sevov vrst *Lactobacillus* z zdravilno učinkovino nitrendipin, smo v vzorcih preverjali tudi prisotnost spojine dehidronitrendipin. Gre za metabolit nitrendipina, pri katerem se dehidropiridinski obroč pretvorji v aromatskega (DrugBank, 2013) Spojino smo v vseh vzorcih odkrili v zelo nizkih koncentracijah, saj je odziv spojine dehidronitrendipin predstavljal le okoli 1 % odziva osnovne spojine nitrendipin. Opazili smo, da je vsebnost spojine dehidronitrendipin pri večini sevov nižja kot v kontroli. Statistično značilno znižanje koncentracije dehidronitrendipina v supernatantih kultur smo določili pri sevih vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*, *Lb. paracasei*, in *Lb. bulgaricus*. Pri sevu *Lb. gasseri K7* smo določili statistično značilno višjo koncentracijo kot v kontroli. Zaradi nizkih vsebnosti dehidronitrendipina v vseh vzorcih in zato, ker ni bilo velikih razlik med kontrolo in sevi, lahko predvidevamo, da so vsebnosti posledica spontane pretvorbe v raztopini. Nižje vsebnosti v vzorcih bi lahko pojasnjevali s tem, da so sevi absorbirali dehidronitrendipin oz. so ga pretvarjali naprej v druge spojine, višje koncentracije pa, da sevi pospešujejo njegov nastanek.

Pri koinkubaciji sevov z zdravilno učinkovino famciklovir smo opazili največji padec koncentracije med vsemi testiranimi zdravilnimi učinkovinami. Vsi sevi so znižali koncentracijo, pri osmih sevih pa je bila razlika glede na kontrolo tudi statistično značilna. Izjema sta bila seva vrst *Lb. plantarum* in *Lb. gasseri* (ATCC 20243) kjer ni bilo signifikantnih razlik, vendar je potrebno poudariti, da so bila odstopanja koncentracij med posameznimi paralelkamizelo velika. Kulture proučevanih laktobacilov so koncentracijo famciklovirja znižale v povprečju med 10 in 20 %. Najbolj sta vsebnost famciklovirja v supernatantu kultur znižala sev vrste *Lb. bulgaricus* in sev *Lb. gasseri K7*. Famciklovir ima zelo nizko logP vrednost (0,6), kar pomeni, da je molekula hidrofilna, zato je bil prehod preko bakterijske membrane otežen. Predvidevamo, da je do znižanja koncentracije famciklovirja prišlo zaradi metabolizma ali pa je prišlo do adsorbcije učinkovine na površino bakterij.

Po koinkubaciji sevov z zdravilno učinkovino famciklovir smo v vzorcih preverjali tudi vsebnost spojine penciklovir. Penciklovir je sicer aktivna oblika zdravilne učinkovine famciklovir. Vsebnost penciklovirja v vzorcih je bila zelo nizka, praktično se je pojavil zgolj v sledovih. Razlike v vsebnosti penciklovirja med supernatanti kultur posameznih sevov in kontrolo so bile nesignifikantne. To pomeni, da proučevani sevi niso vplivali na nastanek penciklovirja, prav tako, pa ga tudi ne metabolizirajo. Domnevamo lahko, da je bila detektirana vsebnost penciklovirja v posameznem vzorcu posledica spontane pretvorbe famciklovirja.

V vzorcih koinkubiranih z zdravilno učinkovino famciklovir, smo identificirali tudi spojino deacetil famciklovir. Tudi ta spojina je bila v vzorcih prisotna v zelo majhnih količinah. Čeprav je bila povprečna vsebnost pri večini sevov nižja od kontrolnega vzorca, smo signifikantno razliko ugotovili le pri sevih vrst *Lb. reuteri* in *Lb. acidophilus*. Ker je bila razlika v vsebnosti deacetil famciklovirja glede na kontrolo nesignifikantna pri večini sevov menimo, da proučevani sevi nimajo večjega vpliva na vsebnost spojine deacetil famciklovir. Tudi vsebnost deacetil famciklovirja v vzorcih je najvrjetnejše posledica spontane pretvorbe v raztopini.

Po koinkubaciji sevov z zdravilno učinkovino raloksifen smo v supernatantih kultur vseh sevov določili nižjo povprečno vsebnost raloksifena kot v kontrolnem vzorcu. Signifikantno razliko smo ugotovili pri polovici, torej pri sevih petih vrst (*Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *Lb. gasseri* (ATCC 20243), *Lb. acidophilus* in *Lb. paracasei*). Vsebnost raloksifena v supernatantih sevov vrst *Lb. reuteri* in *Lb. bulgaricus* je bila podobna kot kontroli. Znižanje koncentracije raloksifena bi lahko povezali z visoko log P vrednostjo molekule (5,2), kar pomeni, da je molekula zelo lipofilna in je lažje prehajala skozi membrane bakterijskih celic. Predvidevamo, da je znižanje koncentracije raloksifena posledica absorbkcije v bakterijske celice.

Proučevanje sevi so v večini znižali tudi koncentracijo verapamila ob koinkubaciji. Izjema je bil sev vrste *Lb. bulgaricus*, kjer je bila koncentracija verapamila višja od kontrole. Do statistično značilnega znižanja koncentracije je prišlo v supernatantih kultur vseh sevov razen pri sevih vrst *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* in *Lb. bulgaricus*. Vsebnost verapamila je najbolj znižal sev vrste *Lb. reuteri* in to za nekoliko manj kot 30 %. Tudi molekula verapamila ima visoko log P vrednost (3,79), kar pomeni, da je lažje prehajala skozi bakterijsko membrano. Predvidevamo, da je tudi znižanje koncentracije verapamila povezana z absorbkcijo v bakterijske celice.

Z ANOVA testom smo preverili ali so razlike med učinkom proučevanih sevov na posamezno zdravilno učinkovino statistično značilne, kar pomeni, da do razlik ni prišlo po naključju. Prav tako smo z ANOVA testom določili obseg signifikance. Po ANOVA testu smo naredili še Bonferronijevo primerjavo, s katero smo ob potrjeni razliki s strani ANOVA testa, seve primerjali s kontrolo. Pri nitrendipinu je bila pri vseh vzorcih razlika nesignifikantna. Pri famciklovirju je bila pri sevu vrste *Lb. paracasei* signifikanca ekstremna ( $p < 0,0001$ ), pri sevu *Lb. gasseri* K7 ( $p = 0,0152$ ) in sevu vrste *Lb. bulgaricus* ( $p = 0,0195$ ) pa je bila razlika signifikantna. Pri raloksifenu je bila razlika signifikantna pri sevu vrste *Lb. paracasei* ( $p = 0,0416$ ), ekstremno signifikanco pa smo določili pri sevu vrste *Lb. casei* ( $p = 0,0001$ ). Pri verapamilu je do velike signifikance prišlo pri sevu vrste *Lb. rhamnosus* ( $p = 0,0041$ ) in sevu *Lb. gasseri* ATCC 20243 ( $p = 0,0075$ ), pri sevu vrste *Lb. reuteri* ( $p < 0,0001$ ) pa je bila signifikanca ekstremna.

Ob koinkubaciji zdravilnih učinkovin z različnimi sevi laktobacilov je prišlo do znižanja koncentracije vseh učinkovin z izjemo nitrendipina. Sevi so znižali koncentracije famciklovirja (v povprečju za 13 %), raloksifena (v povprečju za 10 %) in verapamila (v povprečju za 12 %). Koncentracijo famciklovirja in raloksifena so znižali vsi sevi (10) devetih izbranih vrst laktobacilov, od tega je bila koncentracija signifikantno nižja od kontrole pri osmih sevih koinkubiranih s famciklovirjem in petih sevih koinkubiranih z raloksifenom. Pri koinkubaciji z verapamilom smo pri devetih sevih opazili znižanje koncentracije verapamila, od tega je bilo pri sedmih sevih znižanje signifikantno. Sevi vrst *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius* in *Lb. paracasei* so statistično značilno znižali koncentracije treh učinkovin, famciklovirja, raloksifena in verapamila. Glede na to bi lahko svetovali posebno pozornost ob hkratni uporabi pripravkov, ki vsebujejo te seve in zdravilne učinkovine, vendar pa bi naše domneve morali potrditi z dodatnimi testiranji.

Glede na dobljene rezultate našega dela ne moremo z gotovostjo trditi ali je prišlo do metabolizma izbranih zdravilnih učinkovin s strani proučevanih sevov vrst iz rodu *Lactobacillus*. Predvidevamo, da je znižanje koncentracije zdravilnih učinkovin povezano z absorbcijo ali adsorbcijo zdravilnih učinkovin s strani bakterijske kulture. Absorbcaja in adsorbcija zdravilnih učinkovin pa sta lahko povezani z lipofilnostjo molekul.

Proučevani sevi vrst *Lactobacillus* so s svojim metabolnim sistemom sposobni razgraditi in inaktivirati številne ksenobiotike (tuje molekule), med katere spadajo tudi zdravilne učinkovine (Gänzle in sod., 2007), pa tudi toksične spojine (Fuchs in sod., 2007). Vendar pa so sevi laktobacilov le majhen del kompleksne mikrobne združbe, katera sestavlja prebavni trakt (Montalto in sod., 2009). Tako kompleksno prebavno združbo je težko preučevati v pogojih *in vitro* v kakršnih je potekalo naše delo. Predvidevamo pa lahko, da bi bile naše ugotovitve ponovljive tudi v pogojih *in vivo*. Če povzamemo naše rezultate, lahko ugotovimo, da bi lahko prišlo do morebitnih težav, ob hkratni aplikaciji probiotičnih pripravkov in zdravilnih učinkovin famciklovir, raloksifen in verapamil. Da bi naše domneve lahko potrdili, pa je stvar nadaljnih študij. V te študije bi bilo potrebno vključiti še dodatne zdravilne učinkovine, izboljšati pa bi bilo potrebno simulacijo pogojev gastrointestinalnega trakta. Predvsem bi bilo potrebno preveriti odziv v pogojih *in vivo* in ob prisotnosti še drugi bakterijskih vrst, ki sestavljajo mikrobioto prebavnega trakta.

## 5.2 SKLEPI

- Izbrani sevi vrst *Lactobacillus* se med seboj razlikujejo v hitrosti rasti v gojišču MRS pri temperaturi 37 °C in kapaciteti fermentacije (vrednost pH gojišča MRS po gojenju do optične gostote kulture OD~2,0).
- Po koinkubaciji izbranih sevov laktobacilov zdravilno učinkovino nitrendipin smo ugotovili paradoksnog povišanje koncentracije kar je verjetno posledica eksperimentalne ali analitske napake. Tako nismo ugotovili vpliva izbranih sevov vrst *Lactobacillus* na znižanje koncentracije nitrendipina.
- Poučevani sevi med koinkubacijo z nitrendipinom, niso vplivali na vsebnost metabolita dehidronitrendipin.
- Izbrani sevi laktobacilov med koinkubacijo v gojišču MRS znižujejo koncentracijo famciklovirja, raloksifena in verapamila.
- Po koinkubaciji izbranih sevov z zdravilno učinkovino famciklovir smo v vzorcih identificirali spojine famciklovir, penciklovir in deacetil famciklovir. Sevi niso vplivali na koncentracijo penciklovirja in deacetil famciklovirja.
- Metabolizma zdravilnih učinkovin s strani izbranih sevov vrst *Lactobacillus* nismo potrdili, saj potencialnih metabolitov ne poznamo in jih zato nismo določali.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

V magistrski nalogi smo deset sevov iz vrst *Lactobacillus* koinkubirali z zdravilnimi učinkovinami nitrendipin, famciklovir, raloksifen in verapamil ter določili njihovo vsebnost v supernatantih kultur, ko so dosegle OD približno 2,0. Najprej smo določili rastno krivuljo sevov v gojišču MRS pri 37 °C in izmerili pH vrednosti gojišča ob doseženi optični gostoti kulture okoli 2,0. Po inkubaciji sevov v tekočem MRS gojišču in doseženi optični gostoti OD~2,0 smo kulturam dodali posamezno zdravilno učinkovino in kulture z zdravilno učinkovino koinkubirali eno uro pri 37°C. Po koinkubaciji smo s pomočjo LC-MS/MS metode določili vsebnost posamezne zdravilne učinkovine v brezceličnem supernatantu vzorca. S statističnimi testi smo določili, ali je znižanje vsebnosti zdravilne učinkovine glede na kontrolo (zdravilna učinkovina v tekočem gojišču MRS) signifikantno. Pri vzorcih koinkubiranih z zdravilno učinkovino nitrendipin, smo nepričakovano ugotovili, da je prišlo do navideznega povečanja koncentracije, kar pripisujemo eksperimentalni oz. analitski napaki. Pri ostalih zdravilnih učinkovinah smo ugotovili znižanje vsebnosti, in sicer so vsebnost famciklovirja signifikantno znižali sevi osmih vrst laktobacilov. Vsebnost se je v povprečju znižala za 13 %, najbolj pa je vsebnost znižal sev *Lb. gasseri* K7 (za 19 %). Vsebnost raloksifena so signifikantno znižali sevi petih vrst v povprečju za 10 %. Najbolj pa je vsebnost znižal sev vrste *Lb. paracasei*, in sicer za 13 %. Vsebnost verapamila so signifikantno znižali sevi sedmih vrst, v povprečju za 12 %. Najbolj je vsebnost verapamila znižal sev vrste *Lb. rhamnosus* (za 20 %). Ugotovili smo, da so le sevi treh vrst (*Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius* in *Lb. paracasei*) signifikantno znižali vsebnosti famciklovirja, raloksifena in verapamila. S pomočjo LC-MS/MS smo v vzorcih supernatantov, po koinkubaciji sevov z zdravilnimi učinkovinami preverjali tudi prisotnost nekaterih znanih metabolitov zdravilnih učinkovin. Tako smo v supernatantih vzorcev kultur koinkubiranih z nitrendipinom preverjali vsebnost spojine dehidronitrendipin in opazili, da proučevani sevi vrst *Lactobacillus* znižujejo njeni vsebnosti. Pri vzorcih kultur koinkubiranih s famciklovirjem smo v supernatantih v sledovih identificirali spojini penciklovir in deacetil famciklovir. Vpliva izbranih sevov na vsebnost omenjenih metabolitov nismo ugotovili.

## 6.2 SUMMARY

In the thesis, we coincubated ten strains of the species *Lactobacillus* with active substances nitrendipine, famciclovir, raloxifene and verapamil and determined their content in supernatants of cultures, when they reached optical density OD~2,0. First we determined the growth curve of strains in liquid medium MRS at 37 °C and measured pH value of medium when optical density OD~2,0 was reached. After incubation of strains in liquid medium MRS and reached optical density OD~2,0, each active substances were added to cultures and together coincubated for 1 hour at 37 °C. After coincubation we determined the content of certain active substances in the cell-free supernatants, by using LC-MS/MS method. With statistical tests we determined the significance of the reduction of the content of active substance in comparison to the control (active substance in the liquid medium MRS). In samples, coincubated with the active ingredient nitrendipine, we unexpected found, that there has been a virtual increase of concentration, which we attributed to experimental or analytical error. We determined the influence of bacterial strains on the decrease of concentration of other active substances. The content of famciclovir was significantly reduced by eight strains. The content was reduced on average by 13%, to the largest extent by the strain *Lb. gasseri* K7 (by 19%). The content of raloxifene was significantly reduced by five strains. The content was reduced on average by 10%, to the largest extent by the strain from species *Lb. paracasei* (by 13 %). The content of verapamil was significantly reduced by seven strains, on average by 12 %. The content was reduced to the largest extent by the strain from species *Lb. rhamnosus* (by 20 %). We found that strains only of three species (*Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius* and *Lb. paracasei*) significantly reduced the content of famciclovir, raloxifene and verapamil. After coincubation of strains with active substances we also checked for the presence of some of their well-known metabolites in samples of supernatants, by using LC-MS/MS. In the supernatants of samples coincubated with the nitrendipine, we verified the content of dehydronitrendipine. We found that studied strains of species *Lactobacillus* reduce its content. In samples coincubated with famciclovir, we identified trace amounts of penciclovir and deacetil famciclovir. We did not observe any impact of selected strains the content of these metabolites.

## 7 VIRI

- Abu Shamat M. 1993. The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. International Journal of Pharmaceutics, 97: 1- 13
- Arora T., Singh S., Sharma R. K. 2013. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. Nutrition, 29, 4: 591-596
- Basit A. W., Lacey L. F. 2001. Colonic metabolism of ranitidine: implications for its delivery and absorption. International Journal of Pharmaceutics, 227, 1-2: 157-165
- Basit A. W., Podczeck F., Newton J. M. , Waddington W. A., Ell P. J., Lacey L. F. 2004. The use of formulation technology to assess regional gastrointestinal drug absorption in humans. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 21, 2-3: 179-189
- Brodie B. B., Gillette J. R., La Du B. N. 1958. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. Annual Review of Biochemistry, 27, 3: 427-454
- Claesson M. J., van Sinderen D., O'Toole P. W. 2007. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. FEMS Microbiology Letters, 269, 1: 22-28
- Caldwell J. Hawksworth G. M. 1973. The methylation of methamphetamine by intestinal microflora. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 25: 422-424
- Dehydro Nitrendipine. 2014. Ontario, TLC PharmaChem.  
[http://www.tlcpharmacem.com/tlc\\_item.php?upc=N-060003&li=&sub=](http://www.tlcpharmacem.com/tlc_item.php?upc=N-060003&li=&sub=) (27. 1. 2014)
- Deloménie C., Fouix S., Longuemaux S., Brahimi N., Bizet C., Picard B., Denamur E., Dupret J. M. 2001. Identification and functional characterization of arylamine N-acetyltransferases in eubacteria: evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid. Journal of Bacteriology, 183, 11: 3417-3427
- DrugBank. 2013. Alberta, Open Data Drug & Drug Target Database.  
<http://www.drugbank.ca> (4. 11. 2013)
- Elmer G. W., Remmel R. P. 1984. Role of the intestinal microflora in clonazepam metabolism in the rat. Xenobiotica, 14, 11: 829-840
- Felis G. E., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Current Issues in Intestinal Microbiology, 8, 2: 44-61

Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S. 2007. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 4: 1398-1407

Garrity G., Bell A. J., Lilburn T. G. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Release 5.0. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. New York, Springer: 192-197

[http://mibi.unimuenster.de/imperia/md/content/biologie\\_immb/\\_v/download/fgmtaxonomiews10-11/bergey.pdf](http://mibi.unimuenster.de/imperia/md/content/biologie_immb/_v/download/fgmtaxonomiews10-11/bergey.pdf) (12. 2. 2014)

Gänzle M. G., Vermeulen N., Vogel R. F. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, 24, 2: 128-138

Goldin B. R., Peppercorn M. A., Goldman P. 1973. Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 186, 1: 160-166

GraphPad statistic guide. 2014. La Jolla, GraphPad Software.  
<http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/> (1. 3. 2014)

Grebe S. K, Singh R. J. 2011. LC-MS/MS in the clinical laboratory - where to from here? *The Clinical Biochemist Reviews*, 32, 1: 5-31

Guarner F., Malagelada J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361: 519-519

Haiser H. J., Turnbaugh P. J. 2012. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological Research*, 69, 1: 21-31

Heller J. K. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374-379

Holt R. 1967. The bacterial degradation of chloramphenicol. *Lancet*, 1: 1259-1260

Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101

Iyer C., Versalovic J. 2009. Lactic acid bacteria: probiotics with anti-cancer activities. V: *Lactobacillus molecular biology: From genomics to Probiotics*. Ljungh Å., Wadstrom T. (eds). Lund, Caister Academic Press: 153-168

- Jemal M. 2000. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 14: 422-429
- Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakir E. M. 2013. Heath benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*: ID-481651, doi: 10.5402/2013/481651: 7str.
- Knasmüller S., Steinkellner H., Hirschl A.M., Rabot S., Nobis E.C., Kassie F. 2001. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research*, 1, 480-481: 129-138
- Kitamura S., Sugihara K., Kuwasako M., Tatsumi K. 1997. The role of mammalian intestinal bacteria in the reductive metabolism of zonisamide. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 3: 253-256
- Koch R. L., Beaulieu B. B. Jr., Goldman P. 1980. Role of the intestinal flora in the metabolism of misonidazole. *Biochemical Pharmacology*, 29, 24: 3281-3284
- Koch R. L. , Goldman P. 1979. The anaerobic metabolism of metronidazole forms N-(2-hydroxyethyl)-oxamic acid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 208, 3: 406-410
- Lee N. K., Choi S. H., Park S. H., Park E. K., Kim D. H. 2004. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. *Pharmacology*, 71, 4: 174-180
- Ljungh Å., Wadstrom T. 2009. History of Probiotics and Living Drugs. V: *Lactobacillus molecular biology: From genomics to Probiotics*. Ljungh Å., Wadstrom T. (eds). Lund, Caister Academic Press: 1-2
- Matlock B. C., Beringer R. W., Ash D. L., Page A. F., Allen M. W. 2011. Differences in bacterial optical density measurements between spectrophotometers. Technical note: 52236. Madison, Thermo Fisher Scientific: 4 str.
- McCracken V. J., Gaskins H. R. 1999. Probiotics and the immune system. V: *Probiotics: a critical review*. Tannock G. W. (ed.). Dunedin, Horizon Scientific Press: 85-111
- Meyer A. U. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 24, 5: 449-459

- Meuldermans W., Hendrickx J., Mannens G., Lavrijsen K., Janssen C., Bracke J., Le Jeune L., Lauwers W., Heykants J. 1994. The metabolism and excretion of risperidone after oral administration in rats and dogs. *Drug Metabolism and Disposition*, 22, 1: 129-138
- Mikov M. 1994. The metabolism of drugs by the gut flora. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19, 3: 201-207
- Montalto M., D'Onofrio F, Gallo A., Cazzato A., Gasbarrini G. 2009. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3: 30-34
- Mohsin S., Yang Y., Zumwalt M. 2007. Quantitative analysis of opiates in urine using RRHT LC/MS/MS. Santa Clara, Agilent Technologies: 15 str.
- O'Hara A.M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 7: 688-693
- Okuda H., Ogura K., Kato A., Takubo H., Watabe T. 1998. A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287, 2: 791-799
- Orrhage K., Sillerström E., Gustafsson J.A., Nord C.E., Rafter J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation Research*, 311, 2: 239-248
- Pandeya D. R., D'Souza R., Rahman Md. M., Akhter S., Hyeon-Jin K., Seong-Tshool H. 2012. *Biomedical Research*, 23, 1: 9-21
- Piotrowska M., Zakowska Z. 2005. The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*, 54, 4: 279-286
- Pot B., Tsakalidou E. 2009. Taxonomy and Metabolism of *Lactobacillus* V: *Lactobacillus* molecular biology: From genomics to Probiotics. Ljungh Å., Wadstrom T. (eds). Lund, Caister Academic Press: 3-44
- Pradhan A., Majumdar M. K. 1986. Metabolism of some drugs by intestinal lactobacilli and their toxicological considerations. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 58, 1: 11-15

PubChem. 2013. Rockville Pike, NCBI.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (21. 11. 2013)

Rafii F., Hotchkiss C., Heinze T. M., Park M. 2004. Metabolism of daidzein by intestinal bacteria from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Comparative Medicine, 54, 2: 165-169

Rodney B. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, 4: 430-435

Rowland I. R. 1988. Factors affecting metabolic activity of the intestinal microflora. Drug Metabolism Reviews, 19, 3-4: 243-261

Rowland I. R., Mallett A. K., Wise A. 1985. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. Critical Reviews in Toxicology, 16, 1: 31-103

Scheline R. R. 1973. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. Pharmacological Reviews, 25, 4: 451-523

Schneider H., Simmering R., Hartmann L., Pforte H., Blaut M. 2000. Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. Journal of Applied Microbiology, 89, 6: 1027-1037

Schrezenmeir J., de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73: 361-364

Shu Y. Z., Kingston D. G., Van Tassell R. L., Wilkins T. D. 1991. Metabolism of levamisole, an anti-colon cancer drug, by human intestinal bacteria. Xenobiotica, 21, 6: 737-750

Small D. M., Dowling R. H., Redinger R. N. 1972. The enterohepatic circulation of bile salts. Archive of Internal Medicine, 130, 4: 552-573

Smith G. E., Griffiths L. A. 1974. Metabolism of N-acylated and O-alkylated drugs by the intestinal microflora during anaerobic incubation in vitro. Xenobiotica, 4, 8: 477-487

Sousa T., Paterson R., Moore V., Carlsson A., Abrahamsson B., Basit A.W. 2008. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. International Journal of Pharmaceutics, 363, 1-2: 1-25

Stidl R., Sontag G., Koller V., Knasmüller S. 2008. Binding of heterocyclic aromatic amines by lactic acid bacteria: results of a comprehensive screening trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 3: 322-329

Stojančević M., Bojić G., Salami H. A., Mikov M. 2013. The influence of intestinal tract and probiotics on the fate of orally administered drugs. *Current Issues in Molecular Biology*, 16, 2: 55-68

Strong H. A., Renwick A. G., George C. F., Liu Y.F., Hill M. J. 1987. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria. *Xenobiotica*, 17, 6: 685-696

Svensson U. 1999. Industrial perspectives. V: Probiotics: a critical review. Tannock G. W. (ed.). Dunedin, Horizon Scientific Press: 57-70

Takeno S., Hirano Y., Kitamura A., Sakai T. 1993. Comparative developmental toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121, 2: 233-238

Tobin T., Gutierrez J., Schwartz E., Camargo F., Hughes C., Eisenberg R., Lehner A., Stirling K. 2010. Equine drugs, medications, and performance altering substances: their performance effects, detection, and regulation. Kentucky, College of Agriculture and the Kentucky Agriculture Experiment Station.  
<http://www.thomastobin.com/drugsmeds/drugsmeds.htm> (28. 1. 2014)

Tozaki H., Emi Y., Horisaka E., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S. 1997. Metabolism of peptide drugs by the microorganisms in rat cecal contents. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 18, 6: 929-931

Vanderhoof J. A., Young R. J. 1998. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27: 323-332

Velika raziskovalna oprema. 2014. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 1 str.  
<http://wwwffa.uni-lj.si/raziskave/raziskovalna-oprema/> (21. 1. 2014)

Vermes A., Kuijper E. J., Guchelaar H. J., Dankert J. 2003. An in vitro study on the active conversion of flucytosine to fluorouracil by microorganisms in the human intestinal microflora. *Cancer Chemotherapy*, 49, 1-2: 17-23

Watanabe K., Yamashita S., Furuno K., Kawasaki H., Gomita Y. 1995. Metabolism of omeprazole by gut flora in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84, 4: 516-517

Wilson I.D., Nicholson J.K. 2009. The role of gut microbiota in drug response. Current Pharmaceutical Design, 15, 13: 1519-1523

Yoshisue K., Masuda H., Matsushima E., Ikeda K., Nagayama S., Kawaguchi Y. 2000. Tissue distribution and biotransformation of potassium oxonate after oral administration of a novel antitumor agent (drug combination of tegafur, 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine, and potassium oxonate) to rats. Drug Metabolism and Disposition, 28, 10: 1162-1167

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Borutu Štruklju iz Fakultete za farmacijo, kateri me je sprejel pod svoje okrilje in mi tako omogočil izdelavo magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi somentorju doc. dr. Alešu Berlecu iz Instituta "Jožef Stefan". Hvala za sprejem na Institut in omogočanje neoviranega dela v laboratoriju, za idejno usmerjanje in različno pomoč pri mojem delu. Hvala za vse nasvete, katere sem prejel tekom izdelave naloge.

Zahvala gre tudi dr. Juriju Trontlu iz Katedre za Biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo, ki je opravil analize z LC/MS-MS metodo.

Zahvaljujem se gospe Lini Burkan Makivić iz Knjižnice Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti, ki mi je naročila in posredovala strokovne članke, do katerih sam nisem imel dostopa.

Posebno pa bi se rad zahvalil moji družini in mojemu dekletu Ani Mariji, ki so me ves čas izdelave magistrske naloge podpirali, mi stali ob strani, dajali motivacijo in verjeli v moj uspeh.